

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS



TESIS DOCTORAL

**Aminoácidos acídicos y autoestimulación en la corteza
prefrontal de la rata: estudio neurofarmacológico y
neuroquímico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Manuela Pilar Cobo Aceituno

Director

Francisco Mora Teruel

Madrid

© **Manuela Pilar Cobo Aceituno, 1990**

15.977

Departamento de Fisiología Humana

**Facultad de Medicina
Universidad Complutense
MADRID**



**AMINOACIDOS ACIDICOS Y AUTOESTIMULACION
EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA :
ESTUDIO NEUROFARMACOLOGICO Y NEUROQUIMICO.**

Manuela Pilar Cobo Aceituno

Madrid, Febrero 1990

Algunos de los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral han sido realizados en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Durante la realización de esta Tesis Manuela Pilar Cobo Aceituno ha sido becario del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia (Programa General) (Convocatoria 1986).

Esta investigación ha sido financiada, en parte, a través de los proyectos PB-86-0037 de la DGYCIT y la Fundación RAMON ARECES (Investigador Principal: D. - Francisco Mora Teruel).

A.- INTRODUCCION.

1.- Aspectos generales de la autoestimulación cerebral ...	1
1.1.- Estudios de mapeo	3
1.2.- Estudios histológicos	5
1.3.- Estudios electrofisiológicos	11
1.4.- Lesiones cerebrales y autoestimulación	16
1.4.1.- Fascículo prosencefálico medial- hipotálamo lateral	17
1.4.2.- Área ventrotegmenal	21
1.4.3.- Corteza prefrontal medial	22
1.5.- Estudios neurofarmacológicos y neuroquímicos ...	25
1.5.1.- Noradrenalina	27
1.5.2.- Dopamina	31
1.5.3.- Serotonina	37
1.5.4.- Acetilcolina	40
1.5.5.- Péptidos neurotransmisores	43
1.5.5.1.- Péptidos opiáceos	43
1.5.5.2.- CCK y sustancia P	48
1.5.6.- Aminoácidos neurotransmisores	50
2.- Corteza prefrontal y autoestimulación	54
2.1.- Substratos neuroanatómicos y electro- fisiológicos	60
2.2.- Substratos neurofarmacológicos y neuro- químicos	68
2.2.1.- Dopamina y noradrenalina	69
2.2.2.- Serotonina y acetilcolina	73
2.2.3.- Péptidos neurotransmisores	75
2.2.3.1.- Péptidos opiáceos	76
2.2.3.2.- CCK y sustancia P	77
2.2.4.- Aminoácidos neurotransmisores	80

3.- Resumen y planteamiento de la investigación presentada en esta Tesis Doctoral	82
 B.- <u>MATERIAL Y METODOS.</u>	
1.- Animales	88
2.- Material y procedimientos.	
2.1.- Realización de implantes cerebrales	89
2.1.1.- Implantes para estimulación eléctrica ..	89
2.1.2.- Implantes para estimulación química	90
2.1.3.- Implantes para perfusión "in vivo"	93
2.2.- Procedimiento quirúrgico: Estereotaxia	94
3.- Métodos experimentales.	
3.1.- Estimulación eléctrica cerebral	102
3.1.1.- Obtención de autoestimulación cerebral .	105
3.2.- Registro de la actividad motora	109
3.3.- Estimulación química cerebral	110
3.3.1.- Administración intraventricular	110
3.3.2.- Administración intracerebral	112
3.4.- Perfusión intracerebral "in vivo"	114
3.5.- Análisis de aminoácidos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	120
3.5.1.- Cuantificación de los aminoácidos como OPA-derivados	120
3.5.2.- Condiciones cromatográficas	121
- Calibración	124
- Factor de dilución	126
- Cálculo del coeficiente de variación .	126
- Curva de linealidad	127
3.6.- Histología	130
4.- Métodos estadísticos	132

C.- RESULTADOS.

1.- Estudio dosis-efecto de la administración de antagonistas de los receptores de los aminoácidos acídicos sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial	133
1.1.- Descenso dosis-relacionado de la autoestimulación tras la inyección intraventricular e intracortical de γ -D-glutamilglicina	140
1.2.- Descenso dosis-relacionado de la autoestimulación tras la administración intraventricular e intracortical de 2-amino-5-fonovoalerato	150
1.3.- Efectos de la microinyección intraventricular e intracortical de γ -D-glutamiltaurina	160
2.- Estudio de los perfiles de aminoácidos liberados en la corteza prefrontal medial durante la autoestimulación	168
2.1.- Niveles basales de aminoácidos en la CPM	170
2.2.- Descenso de los niveles de glutámico y glutamina tras la estimulación eléctrica a 0.3 mA de intensidad	172
2.3.- Descenso de los niveles de glutámico tras la estimulación eléctrica a 0.6 mA de intensidad	174
2.4.- Mantenimiento de los niveles de aminoácidos tras la estimulación eléctrica a 0.15 mA de intensidad	176

D.- DISCUSION.

Introducción	181
1.- Sobre los experimentos neurofarmacológicos.	
1.1.- Sobre el diseño experimental	183
1.2.- Sobre los agonistas y antagonistas de los receptores glutamérgicos	186
1.3.- Sobre los receptores NMDA, kaínico y quisquálico y la autoestimulación en la corteza prefrontal medial	190
2.- Sobre los experimentos neuroquímicos.	
2.1.- Sobre la técnica de perfusión "in vivo" "push-pull"	194
2.2.- Sobre el método de análisis de amino- ácidos (HPLC)	201
2.2.1.- Sobre la derivación y detección	203
2.2.2.- Sobre la columna, la fase móvil y el programa de gradientes	205
2.2.3.- Sobre la variabilidad del método	207
2.3.- Sobre los niveles de aminoácidos en la corteza prefrontal medial.	
2.3.1.- Sobre los niveles basales de amino- ácidos	209
2.3.2.- Sobre los efectos de la estimulación eléctrica en los niveles de aminoáci dos acídicos	213
E.- <u>CONCLUSIONES</u>	218
F.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	219
G.- <u>APENDICE.</u>	
1.- Abreviaturas	275

INTRODUCCION

La autoestimulación cerebral fué descrita por Olds y Milner en 1954, y consiste en que un animal es capaz de aprender y ejecutar una respuesta operacional, con objeto de obtener estimulación eléctrica de su propio cerebro a través de un electrodo intracerebral implantado crónicamente. Aún cuando, inicialmente se describió en una especie concreta, la rata (Olds y Milner, 1954), y en ella se han realizado la mayor parte de las investigaciones, también se ha demostrado su existencia en otras especies animales: mono (Brady, 1960), peces (Boyd y Gardner, 1962), delfín (Lilly y Miller, 1962), perro (Stark y Boyd, 1963), aves (Goodman y Brown, 1966), conejos (Bruner, 1966), gatos (Roberts, 1968) y en el hombre (Sem-Jacobsen y Torkildsen, 1960).

En un principio, las investigaciones se centraron en el estudio de las áreas del cerebro que soportan autoestimulación (estudios de mapeo). De forma paralela, y tras conocer las conexiones anatómicas existentes entre dichas áreas, se estudió la influencia de lesiones simples o de la inyección de determinadas drogas sobre la autoestimulación (estudios neuroanatómicos y neurofarmacológicos). Por último, el conocimiento de la localización específica de los diferentes sistemas neurotransmisores y sus vías, así como el desarrollo de técnicas electrofisiológicas (registro unitario) y neuroquímicas (perfusión intracerebral, voltametría y HPLC) ha permitido un avance considerable en el conocimiento de los substratos neuroanatómicos y neuroquímicos que median la autoestimulación cerebral.

La investigación realizada en esta Tesis Doctoral trata de dilucidar la participación de los aminoácidos acídicos, ácidos aspártico y glutámico, en el substrato neuroquímico de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata, empleando tanto técnicas neurofarmacológicas como neuroquímicas.

1.1.- ESTRUCTURAS CEREBRALES QUE SOSTIENEN AUTOESTIMULACION: ESTUDIOS DE MAPEO.

Los estudios de mapeo consisten en localizar las estructuras cerebrales que sostienen autoestimulación. Estas áreas han sido muy bien definidas en la rata y enumeradas en un sentido craneo-caudal son las siguientes: bulbo olfatorio (Phillips y Mogenson, 1969), corteza prefrontal (Routtenberg, 1971,1978; Routtenberg y Sloan, 1972), núcleos septales (Olds y Milner, 1954), núcleo accumbens (Routtenberg y Huang, 1968), amígdala (Wurtz y Olds, 1963; Hodos, 1965), hipocampo (Ursin et al., 1966), caudado (Olds, 1960), cortezas entorinal, retrosplenial y cingular (Stein y Ray, 1959; Brady y Conrad, 1960; Collier et al.,1977). En el diencéfalo ventral las áreas que sostienen autoestimulación se localizan en el hipotálamo lateral y a lo largo del fascículo proencefálico medial (FPM), extendiéndose desde la banda diagonal de Broca hasta el área ventrosegmental de Tsai (Olds y Olds, 1963; Valenstein y Campbell,1966). En el tronco del encéfalo se ha descrito autoestimulación en la sustancia gris central (Cooper y Taylor, --- 1967), sustancia negra (Routtenberg y Malsbury, 1969; Huang y Routtenberg, 1971), núcleos del rafe (St.Laurent et al., 1973; Miliaressis et al., 1975), locus coeruleus (Ritter y Stein, 1973), núcleos profundos del cerebelo y región parabraqiual (Ball et al., 1974), región parabraqiual del tegmento dorsal (Routtenberg, 1976) y en la región del núcleo trigémino (Van der Kooy y Phillips 1977).

Estos estudios han sido revisados sucesivamente por Olds y Olds (1965), Rolls (1974), Olds (1976) -- Olds y Fobes (1981) y Phillips (1984).

Más recientemente, se han realizado estudios de mapeo en diferentes núcleos talámicos, obteniéndose autoestimulación en el núcleo dorsomedial (excepto en su segmento central), núcleos intralaminares (centromedial, parafascicular, paracentral y central lateral), complejo nuclear ventromedial (excepto el núcleo gelatinoso), núcleos de la línea media (romboides, paratenial y paraventricular), núcleos ventrobasal y ventrolateral y grupos nucleares anteriores y posteriores (Clavier y Gerfen, 1982).

Por otra parte, también se ha obtenido autoestimulación en ciertas estructuras cerebrales consideradas aversivas como el hipotálamo medial (Roberts, -- 1968; Schmitt et al., 1977), parte dorsal de la sustancia gris central mesencefálica (Cazala y Zielinski, -- 1983; Cazala et al., 1985; Cazala, 1986), lemnisco medial, tegmentum lateral y formación reticular (Cazala, 1986).

Aún cuando todas las áreas cerebrales anteriormente descritas soportan autoestimulación, la mayor parte de los trabajos realizados en los últimos -- años se han centrado en tres estructuras: el fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral (FPM-HL), área ventrotegmenal (AVT) y corteza prefrontal medial (-- CPM) (Mora y Cobo, 1990).

1.2.- TECNICAS HISTOLOGICAS.

Las técnicas histológicas permiten estudiar las interconexiones anatómicas (aferencias-eferencias) existentes entre las áreas que soportan SS.

En relación a las aferencias, la principal técnica empleada ha sido la técnica del transporte axonal retrógrado de la peroxidasa del rábano. Esta enzima, inyectada en un área, es captada por las terminales axónicas y transportada retrógradamente al soma neuronal donde puede ser fijada y revelada (Graham y Karnovsky, 1966). De esta forma, tras administrar peroxidasa en áreas que sostienen SS se pueden describir las aferencias a las mismas (Hopkins, 1976; Clavier, 1979; Vives et al., 1983).

Mediante esta técnica, Hopkins (1976) mostró que las aferencias mesencefálicas del fascículo prosencefálico medial (porción rostral) provienen en su mayor parte del área ventro tegmental y núcleos del rafe dorsal aunque, en menor proporción, también se originan en el locus coeruleus y sustancia negra. Clavier (1979), por su parte, estudió las aferencias a núcleos de la región pontina que soportan SS, incluyendo el locus coeruleus. Estas aferencias provienen del complejo trigeminal, región parabraquial, fascículo prosencefálico medial, núcleos profundos del cerebelo y núcleos del rafe dorsal. En todas estas áreas cerebrales se ha obtenido SS (Olds y Fobes, 1981).

Más recientemente, Vives et al. (1983) han descrito las aferencias subcorticales a puntos de SS en la corteza prefrontal medial. Estas aferencias provienen, en su mayor parte, de áreas que también sostien

nen SS como el área ventrotegmenal, sustancia negra, rafe central y dorsal, locus coeruleus, amígdala, sustancia gris periacueductal, hipotálamo lateral, zona incerta, sustancia gris periventricular y diferentes núcleos talámicos incluyendo al núcleo dorsomedial del tálamo.

En relación a las eferencias, el primer método empleado fué la tinción de Fink Heimer (1967). Esta técnica permite identificar la degeneración axónica -- originada tras la lesión de un área que previamente -- muestra autotestimulación y, por tanto, permite conocer las eferencias de dicha área (Routenberg, 1971; Huang y Routenberg, 1971). Posteriormente, se ha empleado el transporte axonal anterógrado de aminoácidos radioactivos (L-5-³H-prolina; 2,3-³H-prolina; ³H-leucina, etc..) Estos aminoácidos marcados son inyectados en áreas que soportan SS, y posteriormente se localizan mediante -- técnicas autorradiográficas las estructuras cerebrales donde existen axones o terminales axónicas que contengan aminoácidos radioactivos (Dalssas et al., 1981).

Empleando la técnica de tinción de Fink-Heimer, Huang y Routenberg (1971) mostraron que lesiones de puntos de SS del fascículo prosencefálico medial -- dan lugar a terminales degeneradas en sustancia negra o, si la lesión se localiza en puntos más mediales de dicho fascículo, en el área ventrotegmenal. Ambas estructuras, sustancia negra y área ventrotegmenal, soportan SS (Routenberg y Malsbury, 1969; Crow, 1972). -- También mediante el método de Fink-Heimer se ha descrito en la rata una vía que, originandose en la corteza prefrontal desciende atravesando neostriado, capsula interna y porción lateral del fascículo prosencefálico medial (Routenberg, 1971).

Con el empleo de técnicas autorradiográficas de aminoácidos (35-S-metionina), Dalssas et al. (1981) han corroborado parcialmente estos resultados estudiando las eferencias originadas en puntos de autoestimulación en la corteza prefrontal. Concretamente, han mostrado que la corteza prefrontal envía eferencias a estructuras que, en su mayoría, también soportan SS como son la corteza prefrontal sulcal, hipotálamo, claustró, zona incerta, amígdala, sustancia negra, área ventro--tegmental, núcleos del rafe, núcleo caudado-putamen, -septum, núcleo accumbens, sustancia gris periacueduc--tal, locus coeruleus y varios núcleos talámicos entre los cuales se encuentra el núcleo dorsomedial del tálamo.

Más recientemente, se ha aplicado otra técnica autorradiográfica al estudio de la SS cerebral, la técnica de la 2-deoxiglucosa descrita por Sokoloff et al. (1977). Esta técnica permite detectar las estructuras activadas durante la SS de un área cerebral concreta, basándose en el aumento de su actividad metabólica con el consiguiente mayor consumo de glucosa (Gallistel et al., 1981, 1985; Porrino et al., 1984).

Los estudios realizados con 2-deoxiglucosa - han mostrado que durante la SS del FPM-hipotálamo lateral se activa una proyección bien definida que comienza en la banda diagonal de Broca y atraviesa el FPM lateral al núcleo preóptico para dirigirse caudalmente - al área ventrotegmental (Yadin et al., 1983; Gallistel et al., 1985; Gallistel, 1986). Por el contrario, no se observa activación en núcleo caudado, núcleo accumbens, amígdala ni corteza prefrontal (Gallistel et al., 1985; Gallistel, 1986) (ver fig. 1).

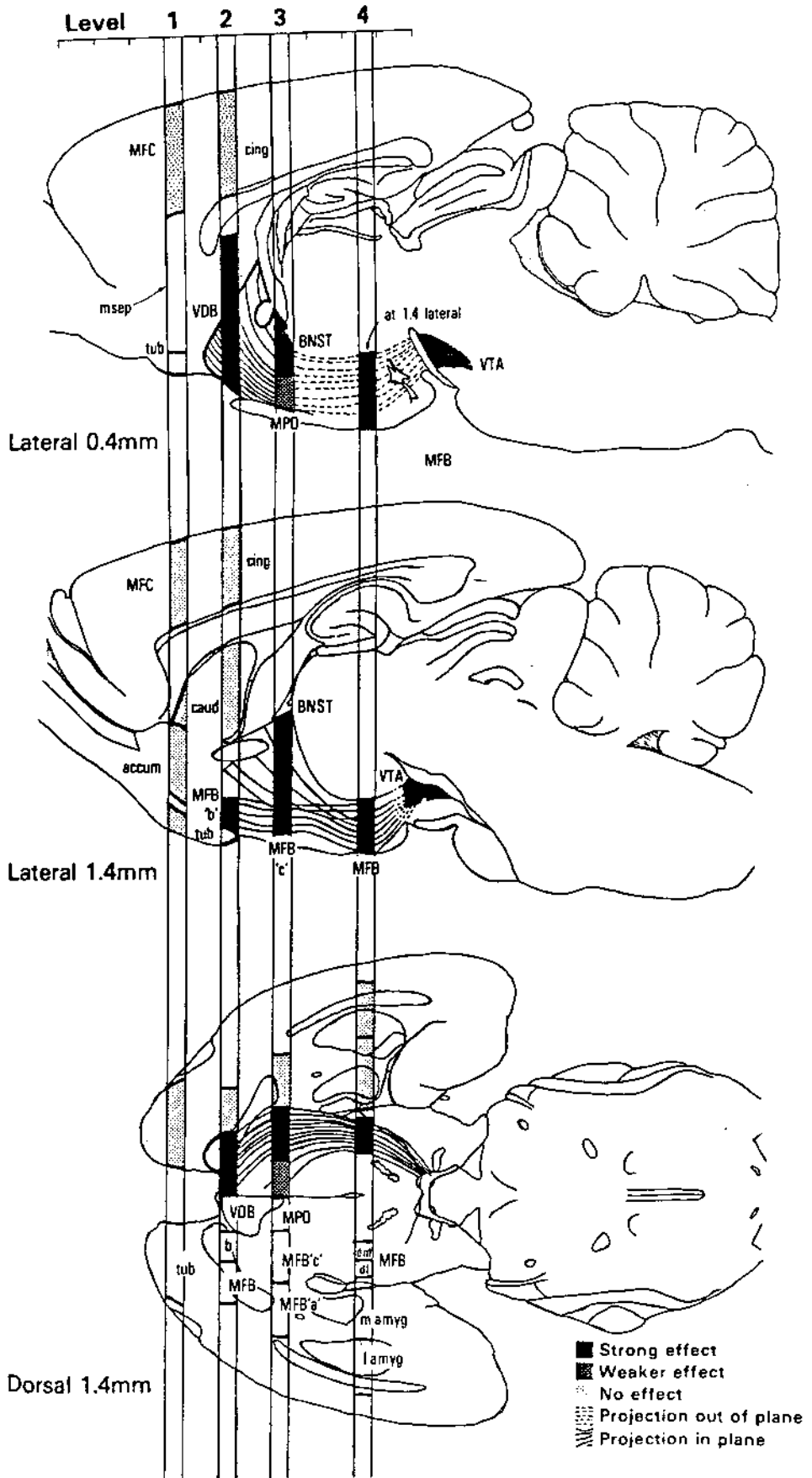
Durante la SS en el área ventrotegmental también se ha observado activación de las fibras que cruzando el FPM se dirigen a la banda diagonal de Broca -- (Porrino et al., 1984). Sin embargo, estos autores han observado una elevada utilización de glucosa en otras -- muchas áreas cerebrales tanto ipsi como contralaterales. Así, existe una activación bilateral en el núcleo ---- accumbens, septum lateral, núcleo rojo de la estria terminal, núcleo dorsomedial del tálamo, hipocampo, locus coeruleus, núcleo parabraquial y rafe dorsal. También -- han observado aumento ipsilateral de la utilización de glucosa marcada en amígdala y corteza prefrontal (Porrino et al., 1984).

Por otra parte, Yadin et al. (1983) han observado que durante la SS en la corteza prefrontal medial existe un patrón de activación muy diferente al del FPM, existiendo una alta actividad metabólica en amígdala basolateral, claustro, núcleo dorsomedial del tálamo y áreas corticales como la corteza piriforme, rinal y entorrinal. La existencia de este patrón diferencial ha sugerido que durante la SS del FPM y la corteza prefrontal medial no se activan las mismas vías y, por tanto, los sustratos neurales que subyacen a la SS son diferentes para cada uno de estos sistemas.

En resumen, los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas histológicas muestran la existencia de conexiones reciprocas entre las diferentes -- áreas que soportan SS y han servido de base para posteriores investigaciones realizadas utilizando técnicas -- electrofisiológicas, lesiones o técnicas neuroquímicas.

FIGURA 1

Representación esquemática, en secciones sagitales y horizontales, del sistema de proyecciones activado durante la estimulación de la parte posterior del fascículo prosencefálico medial (MFB) (tomada de Gallistel et al., 1985). Abreviaturas: accum, núcleo accumbens; b, compartimento "b" del fascículo prosencefálico medial según el atlas de Niewenhuys (1982); caud, caudado; --- BNST, núcleo rojo de la estria terminal; cing, corteza cingular; dl MFB, porción dorsolateral del MFB; dm MFB, porción dorsomedial del MFB; l amyg, mitad lateral del complejo amigdalino; l hab, habénula lateral; l sep, mitad lateral del área septal; m amyg, mitad medial del complejo amigdalino; MFB, fascículo prosencefálico medial según el atlas de Niewenhuys et al.; MFBa, compartimento "a" del MFB según el atlas de Niewenhuys; MFBC, compartimento "c" del MFB según el atlas de Niewenhuys; MFC, corteza prefrontal medial; MPO, área preóptica medial; m sep, mitad medial del área septal; tub, tubérculo olfatorio; VDB, límite vertical de la banda diagonal de Broca; v MFB, porción ventral del MFB.



1.3.- ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Las investigaciones electrofisiológicas sobre autoestimulación cerebral han sido llevadas a cabo mediante registros unitarios realizados durante la conducta operacional, o en animales anestesiados que previamente habían sido testificados con electrodos para autoestimulación (Ito y Olds, 1971; Rolls, 1972). Estos estudios han mostrado que durante la SS en un área cerebral concreta se activan neuronas en otras estructuras que, a su vez, también soportan SS (Rolls et al., 1980). Además, estos estudios han permitido conocer -- las características electrofisiológicas (periodo refractario y velocidad de conducción) de las neuronas de -- áreas que soportan SS como el hipotálamo lateral-fascículo prosencefálico medial, área ventrosegmental y corteza prefrontal (Deutsch, 1964; Gallistel et al., 1969; Bielajew y Shizgal, 1982; Bielajew et al., 1982; Schenk y Shizgal, 1982, 1985).

Los primeros en aplicar la técnica de registro unitario a la autoestimulación fueron Deutsch -- (1964) y Gallistel et al. (1969). Concretamente, estudiaron el periodo refractario de neuronas de áreas que soportan SS, tras la estimulación del fascículo prosencefálico medial, y demostraron que el registro unitario suponía una nueva aproximación experimental al estudio de la autoestimulación.

Estudios posteriores realizados por Rolls -- (1972, 1974, 1975, 1976) analizaron la modificación -- del disparo espontáneo (activación o inhibición) de -- neuronas de diferentes áreas cerebrales durante la au-

toestimulación de un área cerebral concreta. Así, mostró que durante la SS en el hipotálamo lateral se activan - neuronas en amígdala, septum, mesencéfalo y puente. Posteriormente, Segal y Bloom (1974) observaron que durante la SS en el locus coeruleus se produce una inhibición de la actividad espontánea en neuronas de las áreas CA₁ y CA₃ del hipocampo. Sin embargo, es controvertido si esta inhibición es la responsable del mantenimiento de la SS en dicha región pontina (Segal y Bloom, 1974) o está relacionada con otros aspectos neurales (estímulos sensoriales) (Hall et al., 1977).

Otros autores, por su parte, han mostrado que durante la SS de estas dos áreas, hipotálamo lateral y locus coeruleus, se activan neuronas en ambas subdivisiones de la corteza prefrontal (medial y sulcal) en la rata (Ito y Olds, 1971; Rolls y Cooper, 1973). Esta activación también ha sido descrita por Mora et al. (1980) en la corteza orbitofrontal del primate, área que se corresponde con la corteza prefrontal sulcal de la rata - (Leonard, 1969; Krettek y Price, 1977a). Estos mismos autores también mostraron activación de la corteza orbitofrontal del primate durante la SS en amígdala, núcleo accumbens y núcleo dorsomedial del tálamo y, en menor grado, durante la SS en otras áreas cerebrales como el núcleo caudado y la sustancia negra (Mora et al., 1980; Rolls et al., 1980). Esta activación parece ser, en parte recíproca ya que durante la SS en la corteza orbitofrontal se activan neuronas en hipotálamo lateral, amígdala, globus pallidus y sustancia innominata (Burton et al., 1976; Rolls et al., 1980) (ver esquema 1).

Del mismo modo, durante la SS en hipotálamo lateral se activan neuronas en la corteza orbitofrontal,

amígdala y sustancia innominata (Burton et al., 1976; - Rolls et al., 1980). Durante la SS en amígdala basolateral se observan modificaciones del disparo espontáneo - en neuronas de la corteza orbitofrontal, hipotálamo lateral y sustancia innominata (Rolls et al., 1980). Por último, durante la SS en el núcleo accumbens, sustancia innominata o núcleo dorsomedial del tálamo se activan - neuronas en la corteza orbitofrontal, hipotálamo lateral y amígdala (Rolls et al., 1980) (ver esquema 1).

AREA DE REGISTRO	AREA DE AUTOESTIMULACION
Corteza orbitofrontal	←----- Corteza orbitofrontal (OF) Hipotálamo lateral (HL) Amígdala basolateral (ABL) Núcleo accumbens (NA) Sustancia innominata (SI) Núcleo dorsomedial del tálamo (NDMT) Segmento interno del globus pallidus
Hipotálamo lateral	←----- OF, HL, ABL, NA, SI, NDMT
Amígdala basolateral	←----- OF, HL, ABL, NA, SI
Globus pallidus	←----- OF
Sustancia innominata	←----- OF, LH, ABL, NA

Esquema 1.- Tomado de Burton et al. (1976), Mora et al. (1980) y Rolls et al. (1980).

Es interesante que una misma neurona, particularmente en hipotálamo lateral, puede ser activada durante la SS en varias estructuras como la corteza orbitofrontal, amígdala, núcleo accumbens y núcleo dorsomedial del tálamo (Burton et al., 1976; Mora et al., 1980; Rolls et al., 1980). Esta convergencia, sin embargo, no se observó en neuronas de la corteza orbitofrontal del mono (Mora et al., 1980) ni tampoco en la corteza frontal de la rata (Rolls y Cooper, 1973). Más recientemente, Ferron et al. (1984) han mostrado convergencia en la misma neurona de los estímulos procedentes del área ventro tegmental y del núcleo dorsomedial del tálamo, -- aún cuando estos estudios no se han realizado durante la autoestimulación.

En conclusión, estos estudios electrofisiológicos han mostrado que la SS en un área cerebral activa a una población de neuronas en otras áreas cerebrales -- que, en su mayor parte, también soportan SS. Del mismo modo, durante la SS en cada una de estas últimas áreas cerebrales se activan, a su vez, neuronas en el área -- inicial. Estos datos sugieren que en el substrato neural de la SS en un área cerebral concreta pueden participar múltiples circuitos reciprocamente interconectados entre sí (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990).

En cuanto a las características electrofisiológicas de las neuronas de áreas que soportan SS, se ha sugerido que las neuronas responsables de la SS en el fascículo prosencefálico medial poseen axones mielínicos con una velocidad de conducción de 1-8 m/seg (Shizgal et al., 1980; Bielajew y Shizgal, 1982) y un período refractario de 0.4-1.5 mseg (Yeomans, 1975, 1979; -- Bielajew et al., 1982). Estos axones relacionados con la SS DESCENDEN caudalmente desde el hipotálamo lateral

hasta el área ventrotegmental (Bielajew y Shizgal, 1986; Rompré y Miliaressis, 1987). Y parecen originarse, entre otras estructuras, en el septum medial y la banda diagonal de Broca (Rompré y Shizgal, 1986). Por el contrario, las fibras ASCENDENTES dopaminérgicas y/o serotoninérgicas no parecen participar en la SS del fascículo prosencefálico medial (FPM). Efectivamente, las proyecciones dopaminérgicas ascendentes poseen una velocidad de conducción más baja (0.4-0.6 m/seg) y un periodo refractario más largo (2.0 msec) (Takigawa y Mogenson, 1977; Deniau et al., 1980; German et al., 1980; Maeda y Mogenson, 1980; Yin y Mogenson, 1980; Wang, 1981; Fouriezos et al., 1987). Las proyecciones serotoninérgicas ascendentes, por su parte, poseen un rango de velocidades de conducción entre 0.7-6 m/seg (Park et al., 1982; Wessendorf et al., 1981) y un periodo refractario entre 1.2-5 msec (Wang y Aghajanian, 1977).

Estos datos no excluyen la participación de las fibras ascendentes (dopaminérgicas y/o serotoninérgicas) en la SS del FPM pero sugieren, al igual que los estudios histológicos con 2-DG, que las fibras principalmente involucradas son las fibras DESCENDENTES que originándose en la banda diagonal de Broca terminan en el área ventrotegmental (Rompré y Miliaressis, 1987).

En relación a la corteza prefrontal, se ha mostrado que las neuronas relacionadas con la SS en este área cortical poseen un periodo refractario comprendido entre 1.5-6 msec y, en general, presentan unas características electrofisiológicas muy diferentes a los axones del FPM (Schenz y Shizgal, 1982, 1985). Estos datos sugieren, al igual que los estudios histológicos, la existencia de dos sistemas diferentes relacionados con la SS cerebral: el FPM y la corteza prefrontal (Schenz y Shizgal, 1985).

1.4.- LESIONES CEREBRALES Y AUTOESTIMULACION.

Los estudios que utilizan lesiones, se plantean sobre la base de interrumpir conexiones aferentes o eferentes al área donde están situados los electrodos que sostienen autoestimulación. Si las interconexiones existentes entre dos estructuras participan en la SS, su lesión puede facilitar, atenuar o abolir dicho proceso.

En un principio se emplearon los siguientes métodos de lesión: lesión electrolítica, sección mecánica de fibras o inyección intracraneal de anestésicos locales (Boyd y Gardner, 1967; Olds y Olds, 1969; Nakajima., 1976). Una vez conocida la distribución de los somas que contienen monoaminas en el mesencéfalo (Dahlstrom y Fuxe, 1964) y la localización de sus fibras de proyección (Ungersted, 1971; Lindvall et al., 1974), se realizaron lesiones de las estructuras y vías que contienen estos neurotransmisores mediante neurotoxinas que las destruyen selectivamente. Entre ellas se encuentra la 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) que destruye selectivamente las neuronas que contienen catecolaminas (Kostrzewa y Jacobowitz, 1974) y la 5-7-dihidroxi-triptamina que lesiona específicamente las neuronas serotoninérgicas (Baumgarten et al., 1974). Las lesiones realizadas con 6-OH-DA han permitido dilucidar la implicación de los sistemas catecolaminérgicos en la SS cerebral (German y Bowden, 1974; Stein, 1978; Fibiger, 1978).

Posteriormente, se describieron otros agentes neurotóxicos como el ácido kaínico o el iboténico

(neuroexcitotoxinas). Estos compuestos, independientemente de la naturaleza química de las neuronas del área inyectada, destruyen selectivamente los cuerpos neuronales respetando tanto terminales axónicas como fibras de paso (Hattori y McGeer, 1977; Schwarz et al., 1980). Las neuroexcitotoxinas han sido empleadas fundamentalmente para discernir si son neuronas intrínsecas o fibras de paso a través de un área determinada las responsables de la SS en dicha área cerebral (Gerfen y Clavier, 1981; Childs y Gale, 1983; Nassif et al., 1985; Ferrer et al., 1985; Takeichi et al., 1986).

Los trabajos realizados sobre lesiones y autoestimulación cerebral han sido revisados sucesivamente por Valenstein (1969), Lorens (1976a), Olds y Fobes (1981), Phillips (1984), Mora y Ferrer (1986) y Mora y Cobo (1990). La mayor parte de estos trabajos se han centrado en la SS del fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral, área ventrosegmental y corteza prefrontal medial.

1.4.1.- FASCICULO PROSENCEFALICO MEDIAL-HIPOTALAMO LATERAL.

Los estudios realizados en el fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral (FPM-HL), han mostrado que lesiones del FPM disrumpen la SS en hipotálamo lateral. Así, Boyd y Gardner (1967) y Olds y Olds (1969) observaron una atenuación de la SS en hipotálamo lateral tras pequeñas lesiones del FPM en áreas posteriores (núcleo interpeduncular) y anteriores (área preóptica) a la posición del electrodo estimulador. En

las lesiones caudales esta atenuación fué mayor y se recuperó más tardíamente. Estos resultados han sido replicados por Nakajima et al. (1976) tras la inyección intracerebral de procaína y lidocaína y, posteriormente, por Stellar y Neeley (1982) tras lesiones electrolíticas aún cuando empleando una aproximación experimental diferente. Del mismo modo, la inyección unilateral de 6-OH-DA en el FPM produce un descenso de la SS en hipotálamo lateral (Koob et al., 1978). Este descenso parece ser específico puesto que la SS del hipotálamo contralateral a la inyección no se afectó. Sin embargo, otros autores han observado un descenso de la SS tanto en el hipotálamo ipsilateral como en el contralateral (Ornstein y Huston, 1975; Carey, 1982). Este descenso bilateral ha sido explicado en base a que las fibras dopaminérgicas ascendentes, presuntamente implicadas en la SS del FPM, proyectan bilateralmente y, por tanto, en la SS del FPM pueden participar las conexiones a ambos hemisferios (Altar et al., 1983; Jaeger et al., 1983; Pritzel et al., 1983).

Estudios más recientes, sin embargo, cuestionan la participación de las terminales dopaminérgicas en la SS del FPM-hipotálamo lateral. Estos estudios -- han mostrado que la sección mecánica unilateral del FPM a nivel de la comisura anterior, con la consiguiente lesión de las fibras dopaminérgicas, no modifican la SS en hipotálamo lateral (Janas y Stellar, 1987). Por el contrario, las secciones a nivel del área preóptica o anteriores al área ventrotegmenal sí modifican la SS en el hipotálamo lateral (Janas y Stellar, 1987; Waraczynski, 1988). Estas últimas secciones interrumpen, entre otras, las fibras procedentes del área preóptica, banda diagonal de Broca y septum lateral.

Estos datos coinciden con los obtenidos tras los estudios electrofisiológicos anteriormente citados que muestran que los axones implicados en la SS del FPM descienden desde hipotálamo lateral hasta el área ventrotegmental (Bielajew y Shizgal, 1986) y se originan en el septum medial y la banda diagonal de Broca (Rompré y Shizgal, 1986). Además, lesiones tanto electrolíticas como neurotóxicas (ácido iboténico) en el área preóptica, otra de las estructuras de origen, producen un descenso de la SS en hipotálamo lateral (Muñoz et al., 1985; Huston et al., 1987).

Estos resultados sugieren que las fibras fundamentalmente implicadas en la SS del FPM son fibras descendentes que desde la banda diagonal de Broca, septum medial y área preóptica se dirigen al área ventrotegmental (Janas y Stellar, 1987).

No obstante, todas las modificaciones producidas por las lesiones de estructuras límbicas sobre la SS del hipotálamo lateral se caracterizan por ser temporales, tanto las facilitatorias (lesión del septum: Keesey y Powley, 1968) como las inhibitorias (lesión del FPM a varios niveles, lesión de amígdala, hipocampo o área preóptica: Olds y Olds, 1969; Kelly, 1974; Lorens, 1976a; Muñoz et al., 1985; Janas y Stellar, 1987; Waraczynski, 1988). Estos datos sugieren que las estructuras límbicas poseen un efecto modulador sobre la SS en hipotálamo lateral pero no son esenciales para dicho proceso.

Los trabajos de Huston y Boberly (1973) y Stellar et al. (1982) apoyan esta hipótesis ya que tras la lesión tanto bilateral como unilateral del neocortex, estriado, hipocampo, amígdala, septum y parte

del núcleo accumbens, al animal sigue siendo capaz de autoestimularse en hipotálamo lateral, aún cuando en condiciones experimentales especiales.

Recientemente, Colle y Wise (1987) han aportado datos que también corroboran esta hipótesis. Concretamente, han mostrado que la ablación unilateral de la corteza frontal, estriado rostral, núcleo accumbens, área septal y tuberculo olfatorio sólo produce un descenso de un 20-30% en la SS del hipotálamo ipsilateral recuperándose los niveles prelesión tras un periodo de varias semanas. Las áreas lesionadas incluyen la mayoría de las terminales dopaminérgicas ascendentes (Colle y Wise, 1987).

El hecho de que el efecto de las lesiones, tanto de las fibras dopaminérgicas ascendentes como de las fibras no-dopaminérgicas descendentes, sea transitorio ha sugerido la participación de las neuronas intrínsecas en la SS de dicha área (Velley et al., 1983; Waraczynski, 1988). En consonancia con esta hipótesis, se ha mostrado que la administración de ácido iboténico en hipotálamo lateral produce una abolición de la SS en el hipotálamo ipsilateral mientras que no produce ningún efecto en el hipotálamo contralateral (Velley et al., 1983; Nassif et al., 1985; Velley, 1985; Les--tang et al., 1985). Estos datos sugieren que las neuronas intrínsecas al hipotálamo lateral son fundamentales en la SS de dicha área.

En resumen, los resultados obtenidos tras -- las lesiones electrolíticas y neurotóxicas sugieren -- que la SS en el FPM-hipotálamo lateral está mediada -- fundamentalmente por las neuronas intrínsecas así como por las fibras descendentes que desde el hipotálamo la

teral se dirigen hacia el área ventrotegmental y, en menor medida, por fibras dopaminérgicas ascendentes.

1.4.2.- AREA VENTROTEGMENTAL.

En relación al área ventrotegmental-sustancia negra, se ha mostrado que lesiones neurotóxicas del sistema nigroestriatal dopaminérgico producen un descenso de la SS en estriado (Phillips et al., 1976). Este descenso puede ser restaurado tras la implantación de sustancia negra fetal en el núcleo caudado (Fray et al., 1983). Por otra parte, la lesión de la corteza prefrontal (sistema mesocortical dopaminérgico) disminuye la SS en la sustancia negra (Silverman y Corbett, 1989). Estos resultados sugieren la participación de las neuronas dopaminérgicas en la SS de estas áreas cerebrales aún cuando estudios anteriores cuestionaron esta conclusión (Cooper et al., 1978; Phillips y Fibiger, 1978).

Con respecto al área ventrotegmental, Takeichi et al. (1986) han realizado una serie de experimentos para dilucidar si son neuronas dopaminérgicas las responsables de la SS en dicha estructura o, por el contrario, son neuronas intrínsecas no-catecolaminérgicas. Para ello, han realizado lesiones neurotóxicas tanto con 6-OH-DA como con ácido kaínico. La inyección unilateral de 6-OH-DA en el área ventrotegmental de ratas adultas no produce modificaciones de la SS aún cuando el estudio histológico mostró la lesión de las neuronas catecolaminérgicas. Por el contrario, la inyección unilateral de ácido kaínico en el área ventrotegmental pro

duce una abolición de la SS que se mantiene durante -- los 14 días de duración del experimento.

Estos datos sugieren que las neuronas intrínsecas no-dopaminérgicas son el principal factor responsable de la SS en el área ventrotegmental. Es interesante, sin embargo, que lesiones neonatales del sistema dopaminérgico con 6-OH-DA produce un leve, aún cuando significativo, descenso de la SS en el área ventrotegmental. Estos últimos datos sugieren que las terminales dopaminérgicas también pueden jugar un papel en el mantenimiento de la SS aunque no son esenciales para dicho proceso (Takeichi et al., 1986).

1.4. 3.- CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL.

En relación a la corteza prefrontal medial, se han realizado lesiones tanto electrolíticas como -- neurotóxicas de la mayoría de las áreas con las que dicha estructura mantiene conexiones recíprocas (Mora y Ferrer, 1986). Concretamente, se han realizado lesiones del locus coeruleus, núcleo accumbens, corteza prefrontal sulcal, hipotálamo lateral, zona incerta, caudado-putamen, núcleo dorsomedial del tálamo, amígdala basolateral y área ventrotegmental así como de la vía prefronto-cortical a nivel de cápsula externa y corteza entorrinal.

Los resultados obtenidos varían dependiendo del área cerebral lesionada. Así, lesiones del locus coeruleus, núcleo accumbens, zona incerta, FPM-hipotálamo lateral o corteza prefrontal sulcal no modifican la SS en la corteza prefrontal medial (CPM) (Corbett y

Wise, 1980; Corbett et al., 1982a; Ramirez et al., --- 1983; Ferrer, 1984; Robertson et al., 1986a; Cobo et - al., 1989). La lesión del núcleo caudado-putamen, nú-- cleo dorsomedial del tálamo o amígdala basolateral, -- produce un descenso de la SS que se mantiene durante 3- 6 días (Vives et al., 1986; Ferrer et al., 1987).

La lesión electrolítica del área ventroteg-- mental (Vives et al., 1986) o de sus proyecciones dopa minérgicas hacia la CPM (Phillips y Fibiger, 1978) pro-- duce un descenso de la SS que persiste durante los 15- 21 días de duración del experimento aún cuando con una tendencia a la recuperación. De igual forma, lesiones de la vía prefronto-cortical a nivel de cápsula exter- na producen una abolición de la SS que se mantiene du- rante los 17 días de duración del experimento (Cobo et al., 1989). Lesiones de esta vía corticofugal antes de penetrar en cápsula externa también producen un descen- so mantenido de la SS (Corbett et al., 1982a). Este -- descenso, al igual que el obtenido tras la lesión del área ventrotegmental, se recupera 22 días tras la le-- sión (Simon et al., 1979; Robertson et al., 1986a).

En base a estos resultados, se ha sugerido - la existencia de tres categorías diferentes de vías re- lacionadas con la SS en la CPM (Vives et al., 1986): - primera, vías que no parecen estar funcionalmente rela- cionadas con la SS en la CPM: locus coeruleus, núcleo accumbens, zona incerta, hipotálamo lateral y corteza prefrontal sulcal. Segunda, vías cuya activación posee una función moduladora sobre la SS: vías procedentes - del núcleo dorsomedial del tálamo, amígdala y caudado- putamen. Tercera, vías cuya activación es necesaria pa- ra el mantenimiento de la SS en la CPM: la vía mesocor- tical dopaminérgica procedente del área ventrotegmen--

tal y la vía corticocortical que, originandose en la corteza prefrontal medial, se dirige hacia las cortezas entorrinal y perirrinal atravesando cápsula externa.

Estas vías sinapsan, en última instancia, con las neuronas intrínsecas a la CPM. Para dilucidar si estas neuronas que envían eferencias y reciben aferencias de las diferentes áreas cerebrales, son un elemento primordial para la SS en la CPM, se realizaron microinyecciones unilaterales de ácido kaínico (Ferrer et al., 1985) o iboténico (Nassif et al., 1985) en la corteza prefrontal medial. En ambos casos, se obtuvo una abolición completa de la SS en la CPM ipsilateral mientras que no se observaron modificaciones de la SS en la CPM contralateral usada como control. Estos datos sugieren que las neuronas intrínsecas a la CPM son fundamentales para la SS en dicha área.

En conclusión, los resultados obtenidos en los estudios de lesiones sugieren que en el substrato neural de la SS en el FPM-hipotálamo lateral, área ventro tegmental y corteza prefrontal participan fundamentalmente las neuronas intrínsecas a dichas áreas cerebrales así como ciertas vías tanto dopaminérgicas como no dopaminérgicas. Además, el hecho de que ninguna de las lesiones, salvo la lesión de las neuronas intrínsecas, disminuya permanentemente la SS apoya la hipótesis sugerida por Mora y Ferrer (1986). Esta hipótesis propone que durante la SS de un área cerebral concreta se activen múltiples circuitos de forma que, tras la lesión de uno de ellos, el resto de los circuitos no dañados pueden compensar el déficit producido sobre la SS.

1.5.- ESTUDIOS NEUROFARMACOLOGICOS Y NEUROQUIMICOS.

Los estudios neurofarmacológicos y neuroquímicos tratan de dilucidar los posibles neurotransmisores que participan en la SS de un área cerebral concreta.

En un principio se utilizaron exclusivamente técnicas farmacológicas. Concretamente, se observaron las modificaciones de la SS producidas tras inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de diferentes agonistas o antagonistas de los neurotransmisores clásicos (dopamina, noradrenalina, serotonina y acetilcolina). Posteriormente, se realizaron inyecciones tanto intraventriculares como intracerebrales en la estructura objeto de estudio, y se amplió el espectro de sustancias presuntamente neurotransmisoras a péptidos (sustancia P, colecistokinina y péptidos opiáceos) y aminoácidos.

Las técnicas neuroquímicas han sido menos ampliamente utilizadas y su empleo es más reciente. Estas técnicas incluyen la perfusión intracerebral de NT-radioactivos, mediante la técnica de perfusión intracerebral "in vivo" "push-pull", y posterior análisis de los perfundidos mediante contador de centelleo (Holloway, 1975) y mediante cromatografía en capa fina (Mora y Myers, 1977). En segundo lugar, incluye la disección del área objeto de estudio y su posterior análisis mediante HPLC (Phillips et al., 1987) y, por último, incluye el estudio de la liberación de NT "in vivo" mediante voltametría (Stamford et al., 1988). Todas estas técnicas permiten detectar y cuantificar los NT liberados durante la SS, y han sido aplicadas fundamentalmen

te al estudio de la liberación de catecolaminas y sus metabolitos.

Los estudios neurofarmacológicos y neuroquímicos han sugerido que en la SS cerebral no participa un único neurotransmisor sino varios sistemas neurotransmisores interrelacionados entre sí (Mora y Ferrer 1986). Concretamente, los sistemas catecolaminérgicos (dopamina y noradrenalina), la serotonina, la acetilcolina y, más recientemente, dentro del grupo de los péptidos neurotransmisores, la colecistokinina, la sustancia P y los péptidos opiáceos han sido involucrados en la SS de diferentes áreas cerebrales. No obstante, los neurotransmisores implicados en la SS de un área cerebral concreta varían dependiendo del área cerebral considerada (ver a continuación).

1.5.1.- NORADRENALINA.

El primer neurotransmisor presuntamente implicado en la SS cerebral fué la noradrenalina. Esta hipótesis noradrenérgica fué inicialmente propuesta por Stein (1968) basandose en la coincidencia de la localización de las estructuras que soportan SS y las vías noradrenérgicas centrales.

La noradrenalina cerebral tiene su origen en el locus coeruleus (núcleo A_6), núcleos A_1 , A_2 , A_5 y A_7 así como en determinadas áreas de la región de los núcleos del rafe (Dahlstrom y Fuxe, 1964; Ungerstedt, 1971; Lindvall y Björklund, 1974; Jones y More, 1974; Jones et al., 1977). Partiendo de estas estructuras se originan tres vías noradrenérgicas (ver figura 2). Dos de ellas, el fascículo noradrenérgico dorsal y el fascículo noradrenérgico ventral, atraviesan el FPM y han sido implicados en la SS. Así, se ha obtenido SS tanto en el origen de estas vías como en las terminales: corteza cingular, entorrinal y piriforme, hipocampo, septum, amígdala, hipotálamo, núcleo paraventricular y área preóptica (Stein, 1968, 1978; Olds y Fobes, 1981; Phillips, 1984). Sin embargo, no todas las estructuras que reciben terminales noradrenérgicas procedentes del locus coeruleus poseen SS (Olds y Fobes, 1981).

El segundo argumento empleado a favor de la participación de la NA en la SS cerebral está basado en estudios neurofarmacológicos. Estos estudios mostraron que drogas que actúan sobre los sistemas catecolaminérgicos (DA y NA) como los neurolépticos o la d-anfetamina modifican la SS (Stein, 1962, 1964). Además,

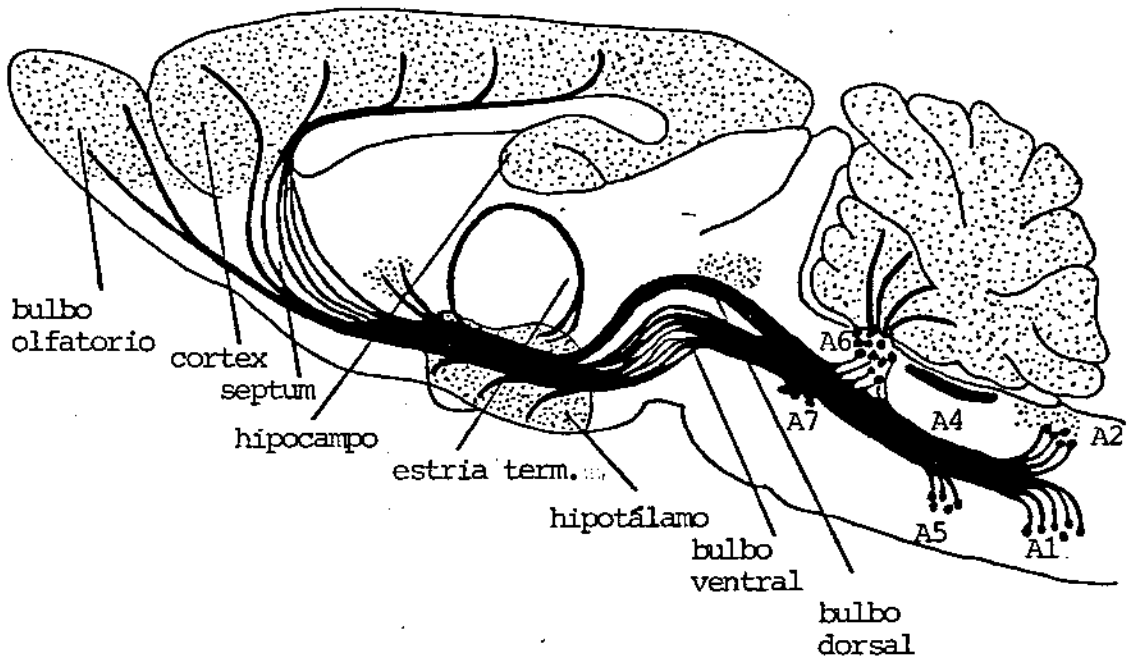


FIGURA 2

Vías noradrenérgicas ascendentes y sus núcleos de origen (tomada de Ungerstedt, 1971).

drogas que inhiben la síntesis de catecolaminas como la α -metil-paratirosina producen una supresión de la SS (Wise y Stein, 1969). Este mismo efecto también se observó tras la inyección de drogas que inhiben selectivamente la síntesis de noradrenalina (como el disulfirán y el dietilditiocarbamate), inhibiendo la acción de la β -hidroxilasa enzima que convierte la DA en NA (Wise y Stein, 1969; Ritter y Stein, 1973). Esta supresión puede ser restaurada mediante la administración intraventricular de NA. Estos datos fueron interpretados como una evidencia de la participación de la noradrenalina en la SS cerebral.

La hipótesis noradrenérgica, sin embargo, ha sido ampliamente rebatida adjudicándose los efectos obtenidos sobre la SS a una sedación o a un impedimento motor del animal (Roll, 1970; Clavier y Routenberg, 1975; Clavier et al., 1976; Clavier y Fibiger, 1977; Fibiger, 1978). Además, se ha observado que otras drogas que también inhiben la síntesis de NA como FLA-63 y U-14,625 no tienen efectos sobre la SS aún cuando reducen sustancialmente los niveles de NA (Lippa et al., 1973; Fuxe et al., 1974; Olds y Fobes, 1981). No obstante, esta falta de efectos puede explicarse según Olds y Fobes (1981) en base a la utilización del "pool" de almacenamiento de NA ya que, tratando a los animales previamente con reserpina, sí se produce una disminución de la SS. Este hecho junto con la observación de que tanto la clonidina (agonista α_2) como la yohimbina (antagonista α_2) producen un descenso de la SS en el FPM, apoya la involucración de la NA en la SS cerebral (Hunt et al., 1978; Gallistel y Freyd, 1987).

El tercer argumento empleado a favor de la -

participación de la NA está basado en estudios neuroquímicos que mostraron un aumento de la utilización de este NT durante la SS (Stein y Wise, 1969). Estos autores, -- tras inyectar NA marcada a través de una cánula "push-pull" y obtener muestras de perfundido durante la SS del FPM, observaron un aumento de NE-marcada en hipotálamo y amígdala. Este aumento fué posteriormente confirmado por Holloway (1975). Este tercer argumento fué criticado por Fibiger (1978). Este autor sugiere que la liberación de NA indica la presencia de neuronas o fibras noradrenérgicas activadas cerca del lugar de estimulación pero no indica que estas neuronas sean las responsables de la SS.

Por último, estudios realizados con 6-OH-DA -- han mostrado que la inyección intraventricular de dicha droga produce un descenso de la SS en el FPM pero no en los núcleos del rafe o el locus coeruleus origen de las vías noradrenérgicas (Olds, 1975; Olds y Fobes, 1981). - Del mismo modo, la inyección de 6-OH-DA en el locus coeruleus no abole la SS en dicho núcleo (Olds y Fobes, --- 1981). Estos datos junto con el hecho de que la eliminación casi completa de las proyecciones noradrenérgicas - no modifica la SS (Cooper et al., 1974; Clavier y Routenberg, 1975; Clavier y Fibiger, 1977; Corbett et al., --- 1977; Ramirez et al., 1983) han desplazado la hipótesis noradrenérgica y han sugerido la participación de otros NT como la dopamina en la SS cerebral. No obstante, la - mediación de la noradrenalina en la SS no se puede des--cartar totalmente (Wise, 1978; Fibiger, 1978; Unemoto y Olds, 1981; Olds y Fobes, 1981; Gallistel et al., 1987).

1.5.2.- DOPAMINA.

En 1974, German y Boyden sugieren la participación de la dopamina en la SS cerebral basandose en la -- coincidencia de la localización de los sistemas dopami-- nérgicos centrales (Ungerstedt, 1971; Berger et al., --- 1974; Lindvall, 1974) y las estructuras cerebrales que - soportan SS. Así, se ha obtenido SS tanto en la sustan-- cia negra (origen del sistema nigroestriatal) y el área ventrosegmental (origen del sistema mesolímbico y meso-- cortical) como en áreas terminales de dichos sistemas: - caudado-putamen, núcleo amigdalino central, septum, nú-- cleo accumbens, tuberculo olfatorio y corteza prefrontal (Olds y Fobes, 1981; Phillips, 1984) (ver figura 3).

Los estudios neurofarmacológicos han apoyado - esta hipótesis dopaminérgica mostrando que drogas que ac-- túan sobre el metabolismo de las catecolaminas modifican la SS cerebral (Olds y Travis, 1960; Stein, 1968; Mora et al., 1975; Ferrer et al., 1983; Gallistel y Freyd, 1987). En este sentido, se ha mostrado que la administración -- tanto sistémica como intracerebral de neurolépticos (blo-- queantes de los receptores dopaminérgicos) produce una - atenuación de la autoestimulación en FPM-hipotálamo late-- ral, área ventrosegmental, corteza prefrontal medial y - sustancia gris central (Mora et al., 1975, 1976b; Fourie-- zos y Wise, 1976; Mora et al., 1977; Franklin, 1978; Ro-- bertson et al., 1981; Gallistel et al., 1982; Ferrer et al., 1983; Hand y Franklin, 1983; Gallistel y Karras, -- 1984; Gallistel et al., 1985; Nakajima et al., 1986; Mi-- liaressis et al., 1986; Fantie y Nakajima, 1987; Ettén-- berg y Duvauchelle, 1988; Van Wolfswinkel et al., 1988; Stellar y Corbett, 1989).

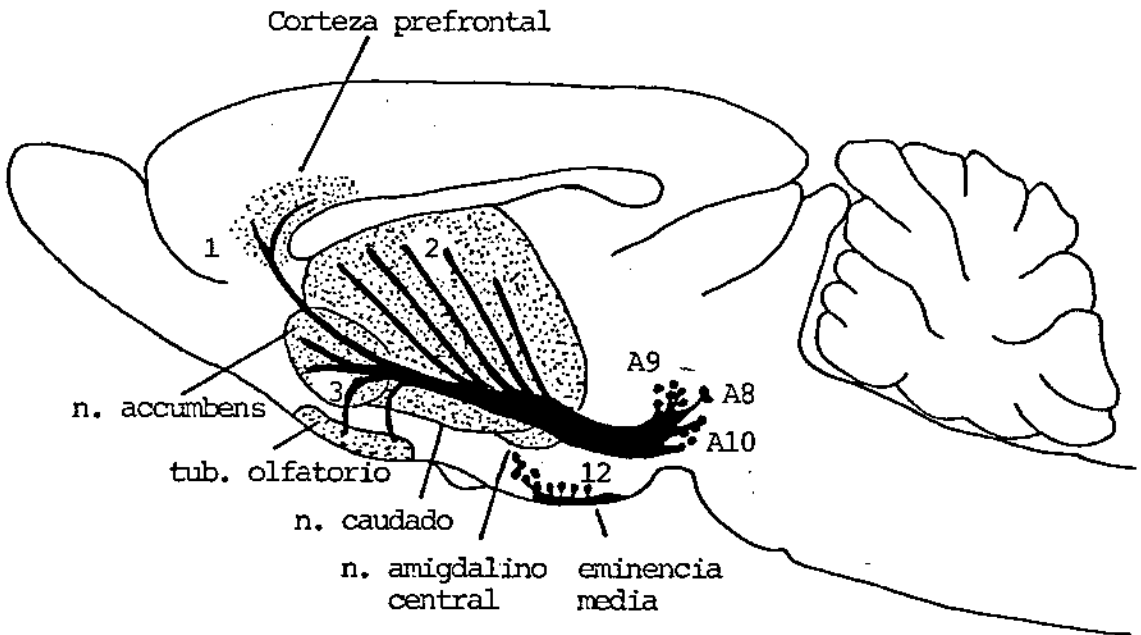


FIGURA 3

Vías dopaminérgicas ascendentes y sus núcleos de origen. 1: vía mesocortical. 2: vía nigroestriatal. 3: vía mesolímbica (modificada de Ungerstedt, 1971).

La atenuación de la SS observada en estas áreas cerebrales tras la inyección de neurolépticos, parece -- ser específica y no debida a un impedimento motor del -- animal (Rolls, 1974; Mora et al., 1975, 1976b; Fouriezos y Wise, 1976; Fouriezos et al., 1978; Franklin, 1978; Wise, 1978, 1982; Ferrer et al., 1983; Stellar et al., --- 1983; Gallistel y Freyd, 1987). Recientemente, Fantie y Nakajima (1987) han corroborado la especificidad de los efectos obtenidos sobre la SS en hipotálamo lateral usando un nuevo método experimental: las ondas hipocámpales teta.

Actualmente, se conoce la existencia de varios tipos de receptores dopaminérgicos, sin embargo aún no -- está claro cual de ellos participa en la SS cerebral. -- Inicialmente, Gallistel y Davis (1983) sugirieron la participación de los receptores D_2 en la SS del FPM. No obstante, posteriormente se ha implicado a los receptores -- D_1 en la SS tanto del FPM-hipotálamo lateral (Nakajima -- et al., 1986) como del área ventrotegmental, corteza prefrontal medial y núcleo dorsal del rafe (Ferrer et al., 1983; Nakajima et al., 1986; Sabater et al., 1989). Re--cientemente, Nakajima y Baker (1989) han involucrado a -- ambos tipos de receptores (D_1 y D_2) en la SS del área -- ventrotegmental.

Otro fármaco empleado en los estudios farmacológicos es la d-anfetamina, droga que aumenta la liberación y bloquea la recaptación de dopamina. Así, se -- mostrado que la administración de d-anfetamina facilita la SS en áreas que contienen dopamina. Concretamente, se ha descrito una facilitación de la SS en FPM-hipotálamo lateral, área ventrotegmental, sustancia negra, corteza prefrontal medial y núcleo accumbens (Phillips y Fibiger,

1973; Espósito et al., 1980; Robertson et al., 1981; -- Hand y Franklin, 1983; Keith y Vaccarino, 1983; Predy y Kokkinidis, 1984; Gallistel y Freyd, 1987). Esta facilitación también se ha observado en áreas que no contienen dopamina como el tegmento dorsal y el hipocampo (Franklin y Robertson, 1982). Por otra parte, la d-anfetamina antagoniza los efectos de los neurolépticos en el FPM (Gallistel y Karras, 1984; Gallistel y Freyd, 1987).

El efecto de la inyección de d-anfetamina es mayor en el hipotálamo lateral y en el área ventrotegmental-sustancia negra que en la corteza prefrontal medial (Robertson et al., 1981; Hand y Franklin, 1983). Esta observación junto con los datos electrofisiológicos y de lesión (Corbett y Wise, 1980; Corbett et al., 1982a) han sugerido la existencia de dos sistemas diferentes en la SS cerebral (Hand y Franklin, 1983; Schenk y Shizgal, -- 1985). Un sistema que incluye el FPM, hipotálamo lateral y área ventrotegmental y un segundo sistema que incluye la corteza prefrontal.

Recientemente, Gallistel y Freyd (1987) han -- confirmado tanto el descenso de la SS en el FPM tras la inyección de neurolépticos como la facilitación de la SS tras la inyección de anfetamina. Además, han sugerido -- que los efectos de los neurolépticos no son debidos a su actuación directa en receptores postsinápticos de vías -- relacionadas con la SS sino indirectos, actuando sobre -- variables cuyos valores deben mantenerse dentro de márgenes estrictos. Esta hipótesis ha sido sugerida en base a estudios farmacológicos, electrofisiológicos y autorradiográficos (2-DG) (Bielajew y Shizgal, 1986; Gallistel, --- 1986; Gallistel y Freyd, 1987; Rompré y Miliaressis, --- 1987).

El tercer argumento empleado a favor de la participación de la dopamina en la SS cerebral es el hecho de que el déficit de la SS observado tras la deplección dopaminérgica del núcleo caudado con 6-OH-DA, puede ser restaurado tras realizar un implante de sustancia negra fetal en el núcleo caudado (Fray et al., 1983).

Los estudios neuroquímicos realizados también apoyan la participación de la dopamina en la SS cerebral. Así, los primeros en mostrar un aumento de la liberación de dopamina durante la SS fueron Mora y Myers (1977). -- Concretamente, estos autores observaron que durante la SS en la corteza prefrontal medial se produce un aumento de la liberación de dopamina en dicha área cortical.

Posteriormente, Phillips et al. (1987) observaron que durante la SS del área ventrotegmental existe un aumento de DOPA, precursor de la dopamina, en el núcleo accumbens, estriado y tuberculo olfatorio. Este estudio se realizó previa inhibición de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos con NSD-1015 (m-hidroxibenzil-hidrazina dihidrocloride). Este aumento de DOPA tras la inhibición de la descarboxilasa parece ser debido a un aumento de la actividad de la tiroxina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de dopamina (Murrin y Roth, 1976; Westerink y Wirix, 1983; Phillips et al., 1987). Estos resultados permiten sugerir que la dopamina juega un papel en la SS del área ventrotegmental (Phillips et al., 1987).

Por último, Stamford et al. (1986, 1988) utilizando técnicas de voltametría "in vivo", han mostrado -- que tras la estimulación eléctrica de otro área, el FPM-hipotálamo lateral, se produce una liberación de dopamina en el núcleo accumbens y caudado-putamen. Dado que el

potencial de oxidación-reducción de DA y NA es indistinguible mediante voltametría, para identificar el compuesto liberado se utilizaron bloqueantes selectivos de ambos neurotransmisores. El bloqueante dopaminérgico aumentó la liberación de dopamina mientras que el bloqueante noradrenérgico no produjo ningún efecto. Estos datos confirmaron que el compuesto liberado tras la estimulación eléctrica del FPM es la dopamina (Stamford et al., 1988).

En conjunto, los estudios neurofarmacológicos y neuroquímicos apoyan la participación de la dopamina - en la SS cerebral aún cuando el papel de dicho neurotransmisor es diferente según el área cerebral estudiada. No obstante, el papel de la dopamina no parece ser exclusivo pues no sólo se ha obtenido SS en áreas exentas de dicho neurotransmisor sino que la deplección de dopamina - en áreas que soportan SS no produce un descenso permanente de la SS en dichas estructuras (Simon et al., 1979; Unemoto et al., 1984; Takeichi et al., 1986).

1.5.3.- SEROTONINA.

La vía serotoninérgica cerebral se origina en los núcleos del rafe dorsal y ventral y, ascendiendo por el fascículo prosencefálico medial, inerva a estructuras diencefálicas, límbicas y corticales como la corteza prefrontal, el núcleo caudado-putamen y el hipotálamo (Ungerstedt, 1971; Breese y Cooper, 1975) (ver figura 4). Todas estas estructuras soportan SS (Olds y Fobes, 1981).

La posible participación de la serotonina en la SS fué sugerida en base a estudios tanto farmacológicos como neuroquímicos. Así, estudios farmacológicos iniciales mostraron que la serotonina tenía un efecto inhibitor sobre la SS cerebral (Stein, 1971; Wise et al., 1973; Pradhan, 1976). Concretamente, Stein (1971) y Wise et al. (1973) observaron una inhibición de la SS en hipotálamo lateral tras inyecciones intraventriculares de serotonina (5-OH-triptamina). Los estudios neuroquímicos, por su parte, mostraron la liberación de serotonina durante la SS del fascículo prosencefálico medial (Holloway, 1975). Sin embargo, al igual que ocurre en el caso de la NA, esta liberación puede ser también debida a la activación de terminales o neuronas serotoninérgicas cercanas al lugar de estimulación pero que no participan en la SS cerebral (Fibiger, 1978).

Estudios farmacológicos más recientes, han sugerido una participación diferencial de la serotonina según el área objeto de estudio. En este sentido, la inyección de paraclorofenilalanina, fármaco que bloquea la síntesis de serotonina inhibiendo a la enzima triptófano hidroxilasa, puede producir un incremento, un descenso -

de la autoestimulación o no producir efectos dependiendo de la estructura cerebral. Así, se ha observado una facilitación de la SS en el FPM, hipotálamo lateral y área ventrotegmental (Poschel y Ninteman, 1971; Van der Kooy et al., 1977a). Por el contrario, similares inyecciones de paraclorofenilalanina producen una disminución de la SS en caudado (Phillips et al., 1976a), núcleos del rafe (Miliaressis et al., 1975; Simon et al., 1976; Van der Kooy et al., 1977b) e hipocampo (Van der Kooy et al., 1977a). Por último, Ramirez et al. (1983) no han observado modificaciones de la SS en la corteza prefrontal medial tras la administración de paraclorofenilalanina.

De igual forma, los efectos del metergoline (bloqueante de los receptores serotoninérgicos) varían según la estructura cerebral considerada. Así, inhibe la SS en la habénula y rafe medial (Nakajima, 1984) mientras que no produce modificaciones en la SS de hipotálamo lateral, área ventrotegmental o núcleo dorsal de rafe (Nakajima y McKenzie, 1986).

Estos datos indican que aún cuando la serotonina puede participar en la SS de algunas áreas cerebrales como el núcleo caudado, hipocampo, habénula y rafe medial, no participa en la SS de otras áreas como el hipotálamo lateral, área ventrotegmental, núcleo dorsal del rafe o corteza prefrontal medial (Van der Kooy et al., 1977a,b; Ramirez et al., 1983; Nakajima, 1984; Nakajima y McKenzie, 1986).

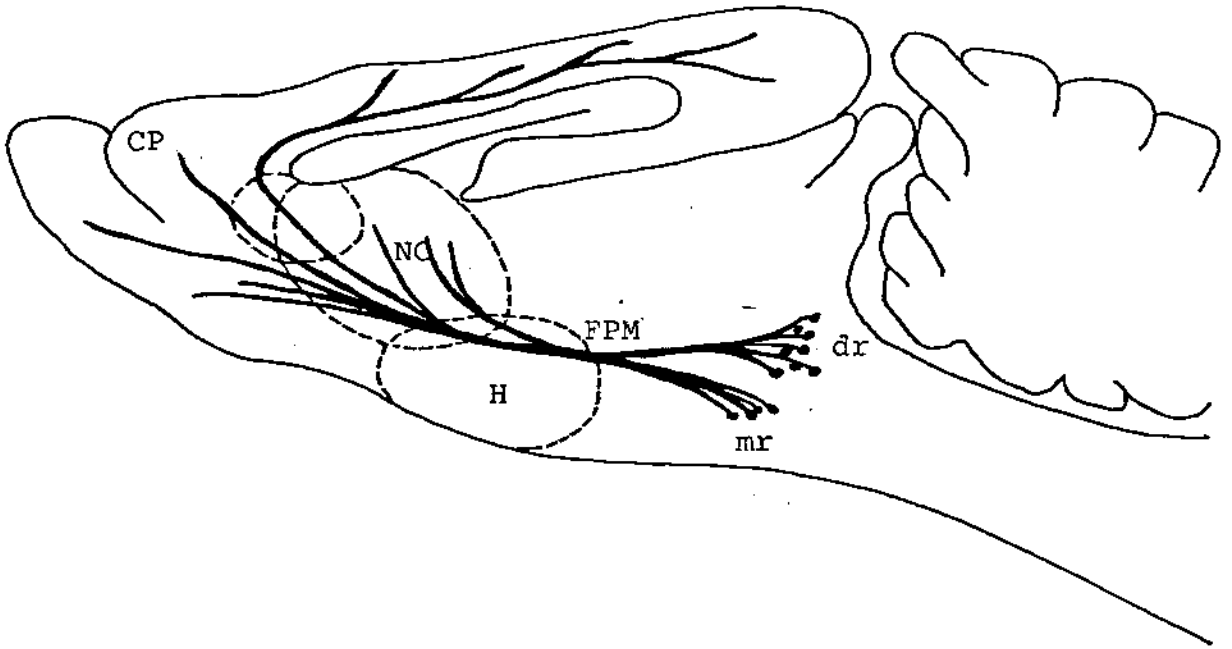


FIGURA 4

Representación esquemática de las vías serotoinérgicas y de sus núcleos de origen (tomada de Breese y Cooper, 1975). Abreviaturas: dr, rafe dorsal. mr, rafe medial. FPM, fascículo prosencefálico medial. H, hipotálamo. NC, núcleo caudado. CP, corteza prefrontal.

1.5.4.- ACETILCOLINA.

La acetilcolina es un neurotransmisor ampliamente distribuido por el sistema nervioso central. Actualmente es bien conocida la localización de los cuerpos neuronales acetilcolinérgicos y sus vías de proyección en el cerebro (Shute y Lewis, 1967; Cuello y Sofroniew, 1984) (ver figura 5).

Los primeros en relacionar los sistemas acetilcolinérgicos con la SS cerebral fueron Stark y Boyd (1963). Posteriormente, Jung y Boyd (1966) sugirieron que la acetilcolina ejerce una acción inhibitoria sobre la SS cerebral basándose en el hecho de que la fisostigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, inhibe dicho proceso. Este efecto inhibitorio de la fisostigmina sobre la SS en hipotálamo lateral fué posteriormente confirmado por Domino y Olds (1968) y Newman (1972). Recientemente, también se ha observado este efecto inhibitorio sobre la SS del área ventrotegmenal (Druhan et al., 1989). Sin embargo, Vives y Mora (1986) tras estudiar el efecto de esta droga sobre la SS de la corteza prefrontal medial, han sugerido que, al menos en lo que se refiere a este área del cerebro, el descenso de la SS producido por la fisostigmina es secundario a una alteración motora del animal.

En relación a los receptores acetilcolinérgicos involucrados, se ha mostrado que la inyección de nicotina facilita la SS en hipotálamo y área ventrotegmenal (Pradhan y Bowling, 1971; Newman, 1972; Druhan et al., 1989). Sin embargo, similares inyecciones de nicotina o mecamilamina (antagonista nicotínico) no producen

ningún efecto sobre la SS de la corteza prefrontal medial (Vives y Mora, 1986).

En relación a los receptores muscarínicos, se ha observado que la administración de agonistas produce un descenso dosis-relacionado de la SS tanto en hipotálamo lateral y área ventrotegmental (Pradhan y Dutta, - 1971; Newman, 1972; Wishart y Herberg, 1979; Druhan et al., 1989) como en la corteza prefrontal (Vives y Mora, 1986). En contraste, tras la inyección de antagonistas muscarínicos se observa una facilitación de la SS tanto en hipotálamo lateral como en el área ventrotegmental - (Newman, 1972; Pradhan y Kamata, 1973; Druhan et al., - 1989) y una inhibición de la SS en la corteza prefrontal medial (Mora et al., 1980b; Vives y Mora, 1986).

Estos datos sugieren que la acetilcolina juega un papel diferente en el substrato neuroquímico de la SS en hipotálamo lateral, área ventrotegmental y corteza prefrontal medial. Además, mientras en la corteza prefrontal medial parece implicar selectivamente a los receptores muscarínicos, en el hipotálamo lateral y área ventrotegmental parece involucrar a ambos tipos de receptores (nicotínicos y muscarínicos).

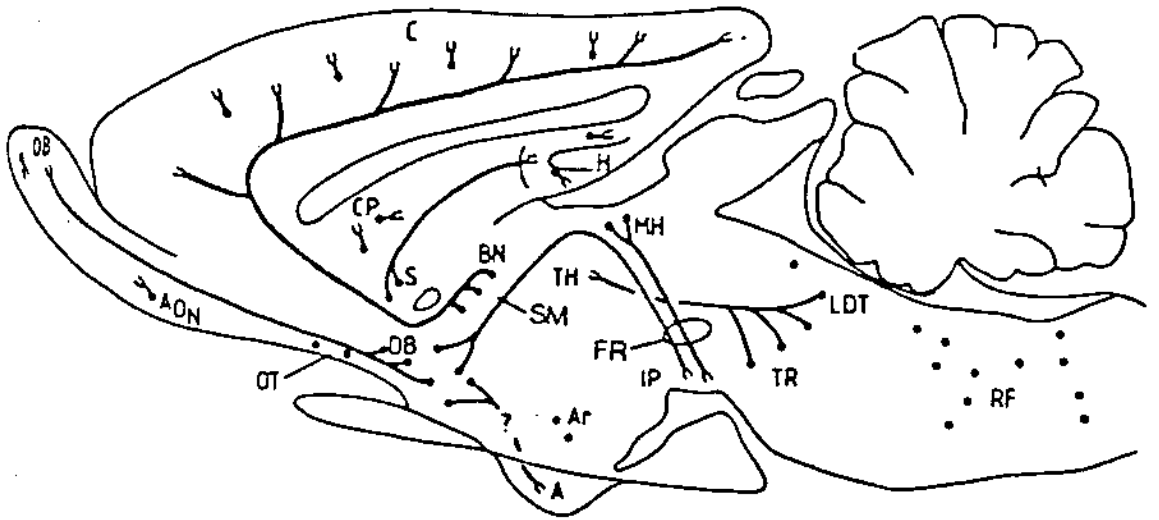


FIGURA 5

Representación esquemática de algunas proyecciones del cerebro de la rata que utilizan acetilcolina como neurotransmisor (Tomada de Cuello y Sofroniew, --- 1984). Abreviaturas: A, amígdala; AON, núcleo olfatorio anterior; Ar, núcleo arcuato; BN, núcleo basal; C, corteza cerebral; CP, caudado-putamen; DB, núcleo de la -- banda diagonal; FR, fascículo retrpflexo; H, hipocampo; IP, núcleo interpeduncular; LAT, núcleo tegmental laterodorsal; MH, habénula medial; OT, tubérculo olfatorio; - RF, formación reticular del tronco cerebral; S, septum; SM, estria medular y TR, sistema reticular tegmental.

1.5.5.- PEPTIDOS NEUROTRANSMISORES.

El hallazgo en el sistema nervioso central de una serie de péptidos neurotransmisores, fundamentalmente endorfinas y encefalinas, así como de colecistokina y sustancia P (Pert y Snyder, 1973; Vanderhaegen et al., 1975; Brownstein et al., 1976; Simantov et al., -- 1977; Dockray, 1980; Cuello, 1983; Krieger, 1983; Sakana et al., 1983), ha abierto un nuevo campo en relación a los substratos neuroquímicos de la SS cerebral.

1.5.5.1.- PEPTIDOS OPIACEOS.

Los péptidos opiáceos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, habiéndose encontrado una alta densidad en hipotálamo, núcleo accumbens, sustancia gris central y locus coeruleus (Simatov et al., 1976, 1977; Belluzi y Stein, 1977; Cuello, 1983). Además, existen tanto receptores opiáceos como neuronas endorfinérgicas en muchas de las áreas cerebrales que soportan SS (Olds y Fobes, 1981; Cuello, 1983).

Estos datos sugieren la posible participación de los péptidos opiáceos en la SS cerebral. Además, estudios farmacológicos han mostrado que la administración de agonistas y antagonistas de los receptores opiáceos modifica la SS en diferentes áreas cerebrales como el área ventrosegmental, sustancia negra, sustancia gris central, núcleo paratenial, globus pallidus, fascículo prosencefálico medial, hipotálamo lateral y corteza prefrontal (Lorens, 1976; Espósito y Kornetsky, 1977; Lieb

man y Segal, 1977; Broekkhamp et al., 1979; Stein y Belluzi, 1979; Nazzaro et al., 1981; Nelson et al., 1981; Schenk et al., 1981; Franklin y Robertson, 1982; Shaw et al., 1984; Ichitani et al., 1985; Stein, 1985; Ichitani e Iwasaki, 1986; Bendani y Cazala, 1988; Carr y Bak, -- 1988; West y Wise, 1988; De Witte et al., 1989).

Concretamente, en relación a la administración de agonistas opiáceos, se ha descrito un efecto bifásico con un descenso inicial seguido de una facilitación de la SS en hipotálamo lateral, corteza prefrontal y -- sustancia gris central, tras la inyección intraperitoneal de morfina (Lorens y Mitchell, -1973; Bush et al., 1976; Esposito y Kornetsky, 1978; Shaw et al., 1984; -- Ichitani e Iwasaki, 1986; Copeland y Pradhan, 1988). El descenso inicial ha sido atribuido a un impedimento motor del animal (Goodall et al., 1976) ya que tras la inyección intracerebral de morfina en el área ventrotemporal se produce exclusivamente un efecto facilitatorio sobre la SS que se inicia a los pocos minutos de la inyección (Broekkamp et al., 1979). Del mismo modo, la inyección intraventricular de ketorfanol, un inhibidor de las encefalinasas (Bouboutou et al., 1984), facilita la SS en hipotálamo lateral inmediatamente tras la inyección aún cuando el mayor efecto se observa a los 25 min. (Heidbreder et al., 1988). Este efecto facilitatorio de morfina y encefalinas sobre la SS puede ser revertido -- tras la administración de naloxona, un antagonista específico de los receptores opiáceos, lo que apoya la participación específica de estos péptidos en la SS cerebral (Olds y Fobes, 1981; Shaw et al., 1984).

Otros estudios han mostrado que tanto la morfina como las encefalinas presentan propiedades de refuerzo. Así, se ha descrito autoadministración cerebral

de estas sustancias en áreas subcorticales específicas - entre las que se encuentran el hipotálamo lateral (Olds y Willians, 1980), área ventrotegmental (Bozart y Wise, 1981) y núcleo accumbens (Olds, 1982). También se ha descrito autoadministración cerebral de morfina y encefalinas en ventrículos laterales (Belluzi y Stein, 1977; Van der Kooy et al., 1977c; Smith et al., 1982).

En relación a los antagonistas de los receptores opiáceos, los resultados obtenidos son contradictorios. Así, algunos autores han mostrado que la administración de naloxona no modifica la SS en el FPM-hipotálamo lateral, núcleo caudado, corteza-prefrontal medial ni en la sustancia gris periacueductal (Wauquier et al., 1974; Holtzman, 1976; Goldstein y Malick, 1977; Van der Kooy et al., 1977c; Lorens y Sainati, 1978; Weibel y Wolf, 1978; Stilwell et al., 1980; Esposito et al., 1980, 1981; Perry et al., 1981; Shaw et al., 1984). Sin embargo, otros autores observan un leve descenso de la tasa de SS o un aumento del umbral de SS en el hipotálamo lateral, sustancia negra, núcleo accumbens y sustancia gris periacueductal (Stapleton et al., 1979; Schaefer y Michael, 1981; Bermudez-Rattoni et al., 1983; Freedman y Pangborn, 1984; Ichitani et al., 1985; West y Wise, 1988). Por último, otros autores han mostrado un descenso muy significativo de la SS en hipotálamo lateral, corteza prefrontal, núcleo accumbens, hipocampo, tegmento dorsal y sustancia gris periacueductal, tras la inyección de naloxona (Belluzi y Stein, 1977; Stein y Belluzi, 1978; Franklin y Robertson, 1982; Trujillo et al., 1983; West et al., 1983; Collier y Routenberg, 1984; Kelsey et al., 1984; Stein, 1985; West y Wise, 1988; Trujillo et al., 1989).

Estas diferencias entre los diferentes grupos

investigadores pueden ser explicadas según West y Wise (1988) en base a tres factores: el área de estimulación, el tiempo transcurrido desde la inyección y los parámetros de la estimulación eléctrica. En relación al área de estimulación, las únicas áreas en las que se ha obtenido un descenso incuestionable de la SS tras la administración de naloxona o naltrexona han sido el núcleo accumbens y el giro dentado del hipocampo (Stapleton et al., 1979; Trujillo et al., 1983; Collier y Routenberg, 1984; Heidbreder et al., 1988). En este mismo sentido, recientemente, West y Wise (1988) han realizado un estudio comparativo de los descensos obtenidos en tres áreas cerebrales (hipotálamo lateral, área ventrotegmental y núcleo accumbens) para valorar la importancia del área de estimulación. Estos autores han observado que aún -- cuando en las tres áreas existe un descenso significativo de la SS, los mayores efectos de la naltrexona se -- producen durante la SS del núcleo accumbens y los menores durante la SS del área ventrotegmental.

En relación al tiempo de duración de la experimentación, se ha observado que los estudios realizados durante la primera media hora tras la inyección de naloxona generalmente no obtienen efectos sobre la SS (Goldstein y Malick, 1977; Lorens y Sainati, 1978) o los efectos son leves (Stapleton et al., 1979). Sin embargo, en los estudios realizados 1 hora tras la inyección de naloxona se observa una disminución significativa de la SS (Belluzi y Stein, 1977; Franklin y Robertson, 1982; Kelsey et al., 1984; Trujillo et al., 1984). La dependencia del tiempo transcurrido desde la inyección ha sido recientemente confirmada por West y Wise (1988). Concretamente, estos autores han observado mayores efectos en la 2ª sesión de experimentación (45 min. post-inyección)

que en la 1° sesión de experimentación (15 min. post-inyección) aún cuando el descenso de la SS se observa desde el comienzo de la experimentación. Por último, los resultados obtenidos por West y Wise (1988) muestran -- que los efectos de la naltrexona son independientes de los parámetros de la estimulación eléctrica.

Actualmente se conoce la existencia de varios tipos de receptores opiáceos, sin embargo, todavía no está claro cual de estos receptores es el fundamentalmente implicado en la SS. Así, se ha mostrado que tanto los opioides con actividad μ -agonista (Hubner y Kornetsky, 1984) como los que poseen acción mixta μ -agonista--antagonista (Unterwald y Kornetsky, 1984, 1986) o los agonistas κ y δ (Reid et al., 1985) facilitan la SS en el FPM. Sin embargo, un estudio reciente ha mostrado -- que la inyección intratalámica de DAGO (μ -agonista) inhibe la SS en hipotálamo lateral mientras que el U50,488 (κ -agonista) la facilita (Carr y Bak, 1988). En base a estos datos, han sugerido que aún cuando ambos tipos de receptores participan en la SS del hipotálamo lateral -- ejercen sobre ella efectos opuestos. Resultados similares han sido obtenidos por De Witte et al. (1989) tras la administración de DAGO (inhibición) y ketorfanol o DTLET (δ -agonista) (facilitación) en los ventrículos laterales y núcleo accumbens.

Todos estos datos apoyan la participación de los péptidos opiáceos en la SS de determinadas áreas cerebrales como el FPM-hipotálamo lateral, área ventrotemporal, corteza prefrontal, tegmento dorsal, sustancia gris periacueductal, hipocampo y núcleo accumbens. Sin embargo, una serie de estudios han sugerido que el efecto de los péptidos opiáceos sobre la SS no es directo -- sino indirecto actuando sobre los sistemas dopaminérgi-

y sus proyecciones (Stein y Belluzi, 1979; Phillips et al., 1981; Shaw et al., 1984; Stein, 1985; Rompré y Wise, 1989a,b).

1.5.5.2.- COLECISTOKININA Y SUSTANCIA P.

Tanto la colecistokinina (CCK) como la sustancia P (SP) se han localizado en estructuras que sostienen SS como la corteza prefrontal medial, área ventrotemporal, hipotálamo y amígdala (Krieger, 1983). No obstante, existen pocos trabajos correlacionando estos péptidos con la SS en dichas áreas.

En relación a la sustancia P, Goldstein y Malik (1977) mostraron una atenuación de la SS en hipotálamo lateral tras la administración intracerebral de sust. P en esta misma área. Igualmente, Ferrer et al. (1988) han observado un descenso de la SS en otra área diferente, la corteza prefrontal medial, tras la administración tanto intraventricular como intracortical de sust. P.

Estudios realizados tanto "in vivo" como "in vitro" han mostrado que la sustancia P interactúa con la dopamina en estructuras cerebrales donde ambos neurotransmisores están presentes (Cheramy et al., 1977; Eison et al., 1978; Starr, 1982; Elliot et al., 1986). Esta interacción DA-sust. P, ha sugerido que la participación de la sust. P. en la SS de hipotálamo lateral y corteza prefrontal medial puede estar mediada, al menos en parte, a través de su actuación sobre los sistemas dopaminérgicos (Mora y Ferrer, 1986; Ferrer et al., 1988; Mora y Cobo, 1990).

En relación a la colecistikinina, Kornblith - et al. (1978) han mostrado que la administración intraperitoneal de dicho péptido inhibe la SS en hipotálamo lateral y locus coeruleus. Posteriormente, Fekete et al. (1983, 1987) han observado un descenso de la SS en --- FPM-hipotálamo lateral pero, en este caso, tras inyecciones intracerebrales de CCK-8 en dicha área cerebral. Más recientemente, otros autores han corroborado estos resultados indicando que no todas las formas de CCK poseen efecto (Balazs et al., 1988; Heidbreger et al., -- 1989). Así, mientras la CCK-8, la CCK-5-8 y su análogo BDNL-CCK7 (CCK-17-33) inhiben la SS en hipotálamo lateral, la CCK-2-4 es inefectiva.

En contraste, inyecciones tanto intraventriculares como intracorticales de CCK-8 realizadas en otra área cerebral, la corteza prefrontal medial, no modifican la SS en dicha área cortical (Ferrer et al., 1988).

Estos resultados sugieren que la CCK participa en la SS de ciertas estructuras como el FPM-hipotálamo lateral y núcleo accumbens, pero no está envuelta en los substratos neuroquímicos de la SS de otras áreas cerebrales como la corteza prefrontal medial.

1.5.6.- AMINOACIDOS NEUROTRANSMISORES.

Los aminoácidos presuntamente neurotransmisores como el ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), GABA, glicina, taurina y β -alanina, además de su papel neurotransmisor (Fagg y Lane, 1979), poseen funciones metabólicas y estructurales (Matsumoto et al., 1982; -- Ottersen y Storm-Mathisen, 1984). Así, todos ellos forman parte del metabolismo intermediario y, a excepción del GABA, forman parte de proteínas.

Entre los aminoácidos presuntamente neurotransmisores, los aminoácidos acídicos (aspártico y glutámico) y el GABA han sido los más estudiados. Estos aminoácidos están ampliamente distribuidos por el sistema -- nervioso central (Iversen, 1982; Walker, 1983; Ottersen y Storm-Mattisen, 1984). No obstante, existen variaciones apreciables de unas áreas cerebrales con respecto a otras (De Feudis et al., 1970; Johnson y Aprison, 1971; Okada et al., 1971; Davison, 1981; Ottersen y Storm-Mathisen, 1984). Así, el hipotálamo, la sustancia negra y el núcleo pálido son las áreas con mayor contenido endógeno de GABA (De Feudis et al., 1970; Okada et al., --- 1971; Davison, 1981; Ottersen y Storm-Mathisen, 1984) - mientras que los niveles máximos de glutámico se localizan en el lóbulo piriforme y la corteza que rodea a la cisura de Silvio (Johnson y Aprison, 1971) fundamentalmente en las células piramidales (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984). También se han encontrado altos niveles de glutámico en estriado y corteza somatosensorial (Johnson y Aprison, 1971).

Más recientemente, se han estudiado las vías

cerebrales probablemente mediadas tanto por GABA (Fagg y Foster, 1983) como por aspártico y glutámico (Fagg y Foster, 1983; Cotman et al., 1987). Estas vías pueden - observarse en las figuras 6 y 7.

No obstante, a pesar de la localización de am bos neurotransmisores en estructuras que soportan SS, - en la revisión bibliográfica realizada para esta Tesis Doctoral, sólo hemos encontrado dos trabajos relacionando aminoácidos y SS (Willians y Herberg, 1987; Backus - et al., 1988). Ambos estudios han mostrado un descenso de la SS en hipotálamo lateral tras la administración - de agonistas gabérgicos. No obstante, dado que los agonistas gabérgicos producen modificaciones de la actividad motora de los animales, sería necesaria más información para demostrar la especificidad de los efectos obtenidos sobre la SS (Willians y Herberg, 1987).

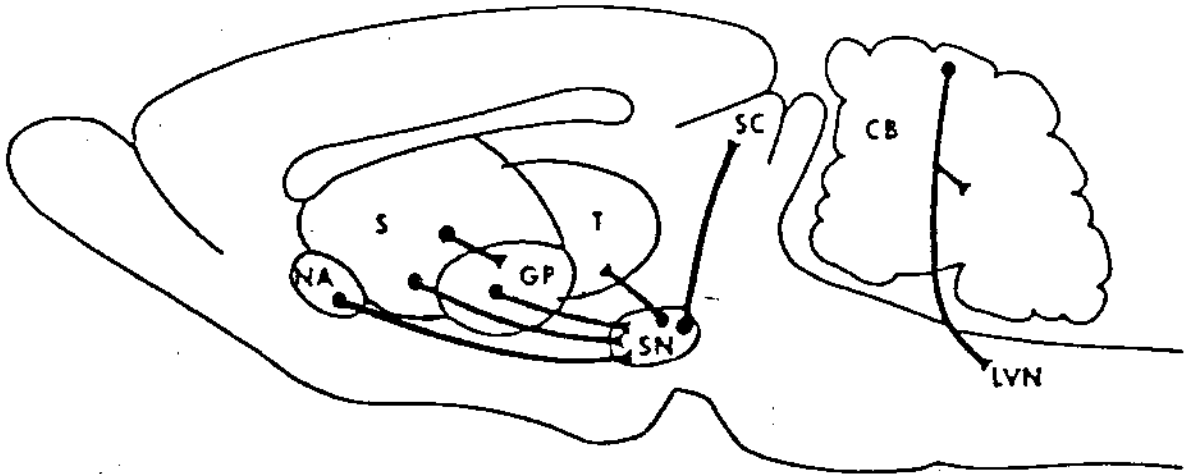


FIGURA 6

Representación esquemática de algunas proyecciones del cerebro de la rata que emplean GABA como neurotransmisor (tomada de Fagg y Foster, 1983). Abreviaturas: CB, cerebelo; GP, globus pallidus; LVN, n. vestibular lateral; NA, núcleo accumbens; S, estriado; SC, colículo superior; SN, sustancia negra; T, tálamo.

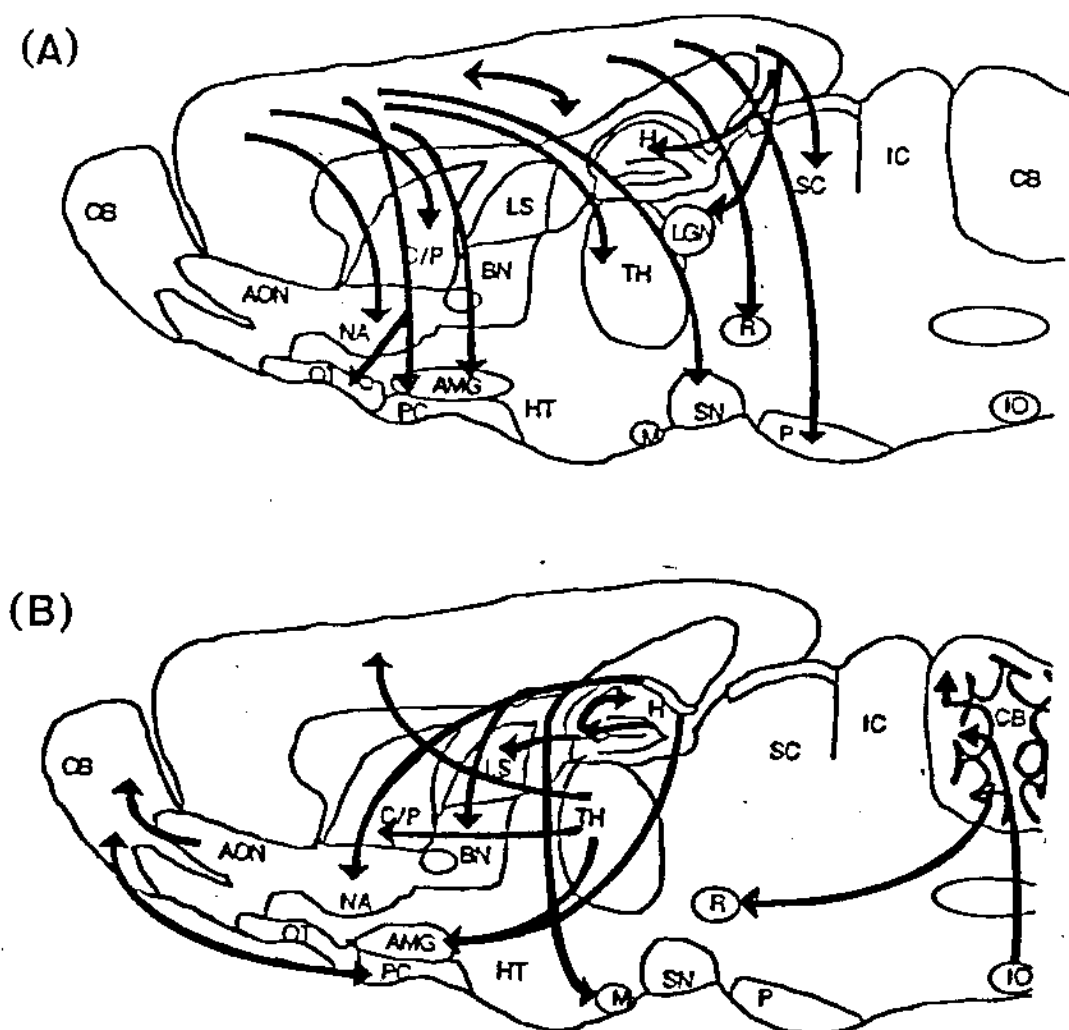


FIGURA 7

Representación esquemática de algunas vías -- del SNC de la rata en las que se ha propuesto como neurotransmisores a aminoácidos acídicos. (A) Vías corticofugales. (B) Vías subcorticales (tomada de Cotman et al., 1987). Abreviaturas: OB, bulbo olfatorio; AON, n. olfatorio anterior; NA, n. accumbens; OT, tuberculo olfatorio; AMG, amígdala; PC, corteza piriforme; C/P: caudado-putamen; LS, septum lateral; BN, n. rojo de la estria terminal; HT, hipotálamo; M, cuerpos mamilares; TH, tálamo; H, hipocampo; LGN, n. geniculado lateral; SN, sustancia negra; R, n. rojo; SC, coliculo superior; IC, coliculo inferior; P, n. pontinos; CB, cerebelo; IO, complejo olivar inferior.

2.- CORTEZA PREFRONTAL Y AUTOESTIMULACION.

La corteza frontal es el área del neocortex de más reciente adquisición, tanto filogenética como ontogénicamente, y tiene su mayor grado de desarrollo en el ser humano (Fuster, 1980).

Dentro de ella, se localiza la corteza prefrontal que ha sido definida como el área del polo frontal que recibe las proyecciones del núcleo dorsomedial del tálamo (Rose y Wolsey, 1948; Leonard, 1969, 1972). En la corteza prefrontal de la rata, Leonard (1969) distinguió dos regiones perfectamente diferenciadas: la corteza prefrontal medial y la corteza prefrontal sulcal. Posteriormente Krettek y Price (1977a) ampliaron los estudios iniciales de Leonard y observaron que las proyecciones del núcleo dorsomedial del tálamo a la corteza prefrontal -- presentan una estricta sistematización topográfica. Estas proyecciones terminan preferentemente en la capa III y, en menor proporción, en las capas corticales I y VI (-- Krettek y Price, 1977a).

La corteza prefrontal es un área de creciente interés en Neurobiología dada su participación en funciones cognitivas, mnésicas y motivacionales (Fuster, 1980; Kolb et al., 1982; Kolb, 1984). Así, se ha descrito que la lesión de este área cortical origina alteraciones de la orientación temporo-espacial y de la memoria a corto plazo (Fuster, 1980; Kolb et al., 1982). Igualmente, se ha involucrado en procesos patológicos como las demencias preseniles (Candy et al., 1983) y la esquizofrenia (Weinberger y Wyatt, 1981; Cohen et al., 1988; Weinberger, 1988).

Además de las aferencias procedentes del núcleo dorsomedial del tálamo utilizadas para definir la corteza prefrontal, este área cortical establece conexiones - tanto aferentes como eferentes con otras muchas estructuras situadas en corteza, prosencéfalo basal, tálamo, hipotálamo y mesencéfalo (Divac et al., 1978; Beckstead, - 1979; Dalssas et al., 1981; Sakanaka et al., 1983; Sarter y Markowitsch, 1983; Vives et al., 1983). Un esquema simplificado de estas conexiones se muestra en las figuras 8, 9 y 10 (Kolb, 1984).

En la corteza prefrontal se han localizado la mayoría de los neurotransmisores conocidos en la actualidad. Concretamente, se ha demostrado la localización en este área cortical de dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina, péptidos neurotransmisores (colecistocinina, sustancia P, encefalinas, neurotensina, neurofisi-sina, somatostatina, bombesina y neuropéptido Y) y aminoácidos neurotransmisores (GABA, ácido aspártico y glutámico) (Ungerstedt, 1971; Berger et al., 1974; Lindvall et al., 1974; Emson, 1978; Emson y Lindvall, 1979; Emson et al., 1979; Fonnum et al., 1981b; Willians y Zieglgansberger, 1981; Quirion et al., 1982; Krieger, 1983; Melusam et al., 1983; Phillipson y Gonzalez, 1983; De Quidt y Emson, 1986; Lewis et al., 1986; Esclapez et al., 1987; Kritzer et al., 1987; Schwartz et al., 1988; Kalsbeek, - 1989).

Routenberg (1971) en un estudio de mapeo sistemático demostró que, en la corteza frontal, sólo aquellas dos áreas definidas como corteza prefrontal (medial y sulcal de Leonard) soportan SS cerebral. Además, la corteza prefrontal en sus dos subdivisiones, es la única área -- del neocortex que sostiene SS en la rata (Routenberg, -- 1971, 1978; Routenberg y Sloan, 1972).

La autoestimulación de la CPM presenta características claramente diferentes de la SS en otras áreas cerebrales como FPM-hipotálamo lateral, área ventrotemporal, hipocampo, septum o caudado (Rolls, 1975; Robertson et al., 1981; Corbett et al., 1982b; Hand y Franklin, 1983; Yadín et al., 1983; Schenk y Shizgal, 1985; Robertson et al., 1986b). Para dilucidar los substratos neuroanatómicos y neuroquímicos que subyacen a la SS de la corteza prefrontal medial se han realizado un gran número de trabajos. Así, los estudios neuroanatómicos han mostrado la participación de las neuronas intrínsecas y de ciertas vías tanto aferentes como eferentes en la SS de la CPM (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990). Los estudios neuroquímicos, por su parte, han sugerido la participación de varios de los neurotransmisores presentes en la corteza prefrontal medial. Concretamente, la dopamina, la acetilcolina, los péptidos opiáceos y la sustancia P (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990).

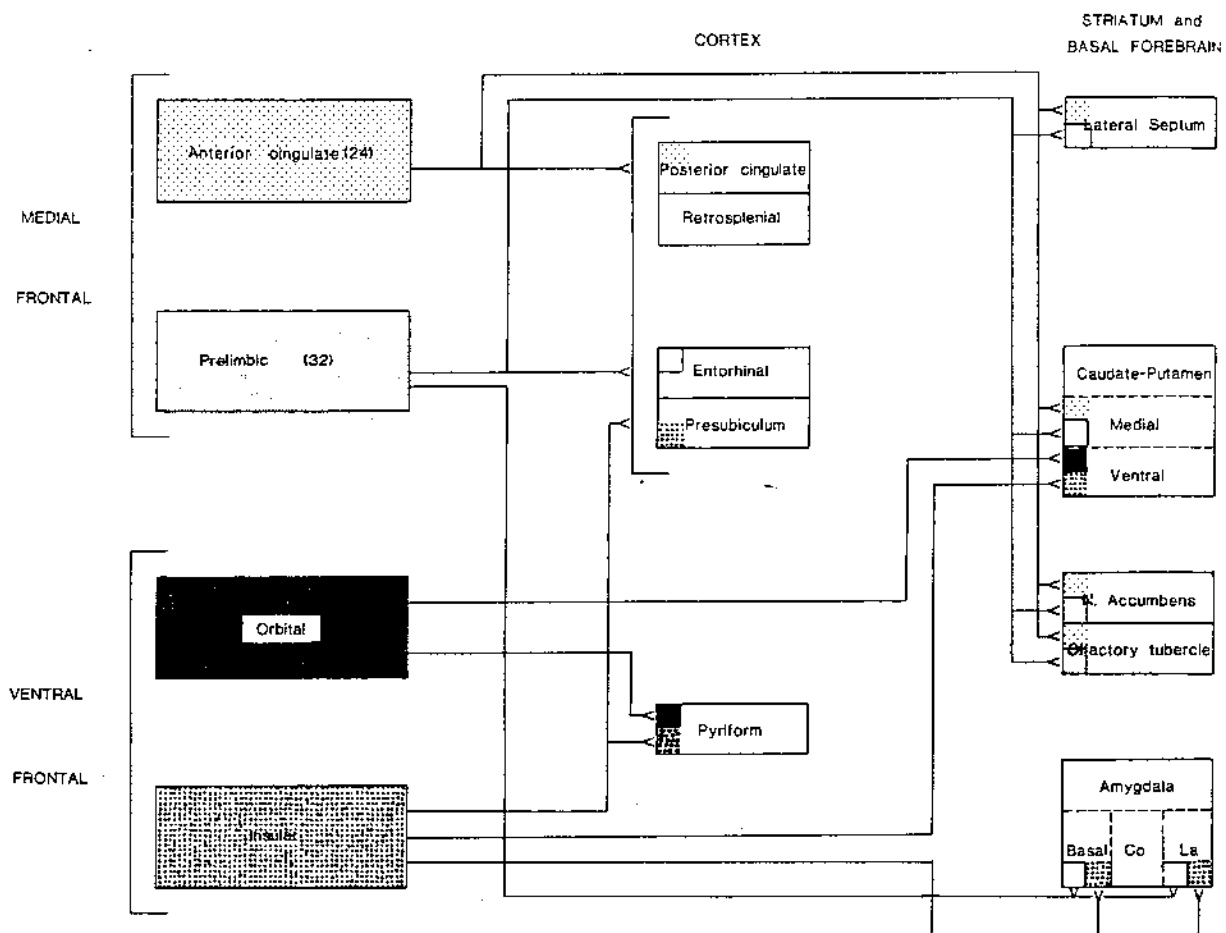


FIGURA 8

Representación esquemática de las eferencias a la corteza prefrontal procedentes de la corteza, estriado y prosencéfalo basal (Tomada de Kolb, 1984). El área medial frontal es equivalente a la corteza prefrontal medial y el área ventral frontal a la corteza prefrontal -sulcal.

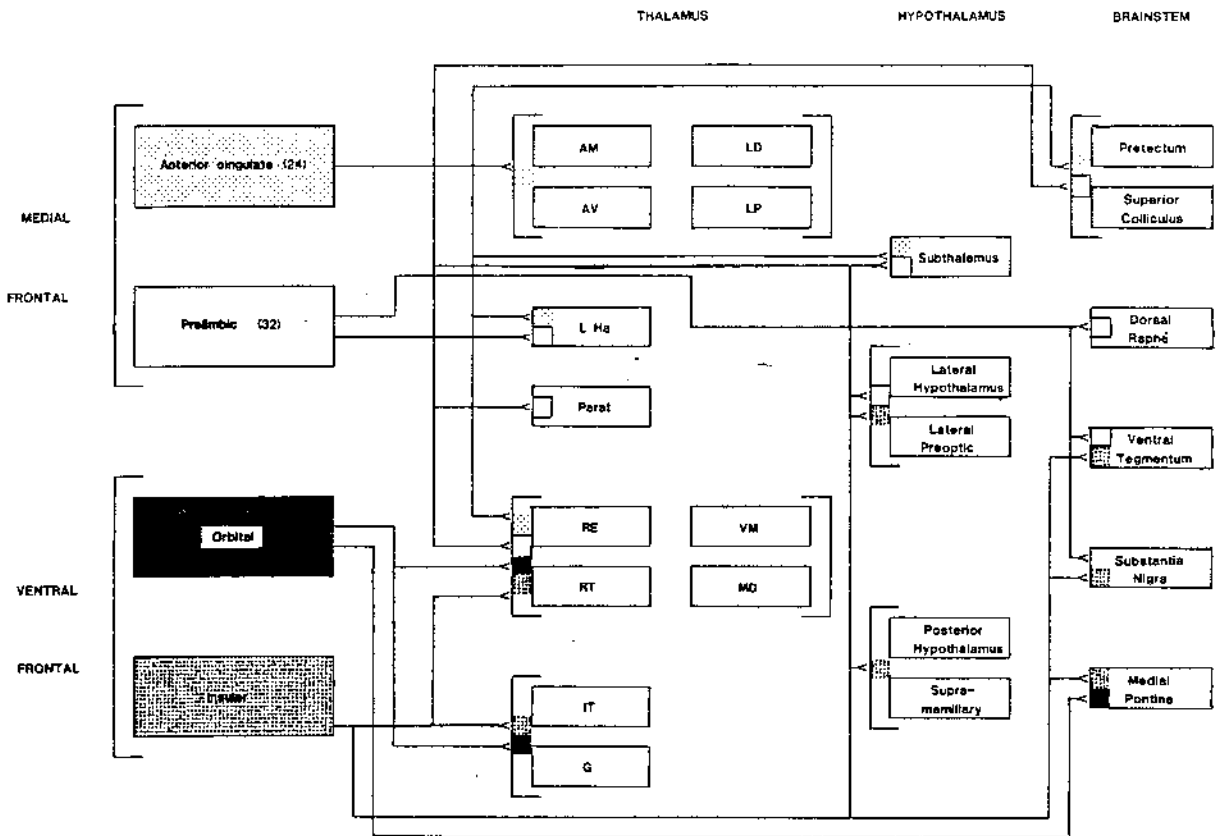


FIGURA 9

Representación esquemática de las eferencias a la corteza prefrontal procedentes del tálamo, hipotálamo y mesencéfalo (Tomada de Kolb, 1984).

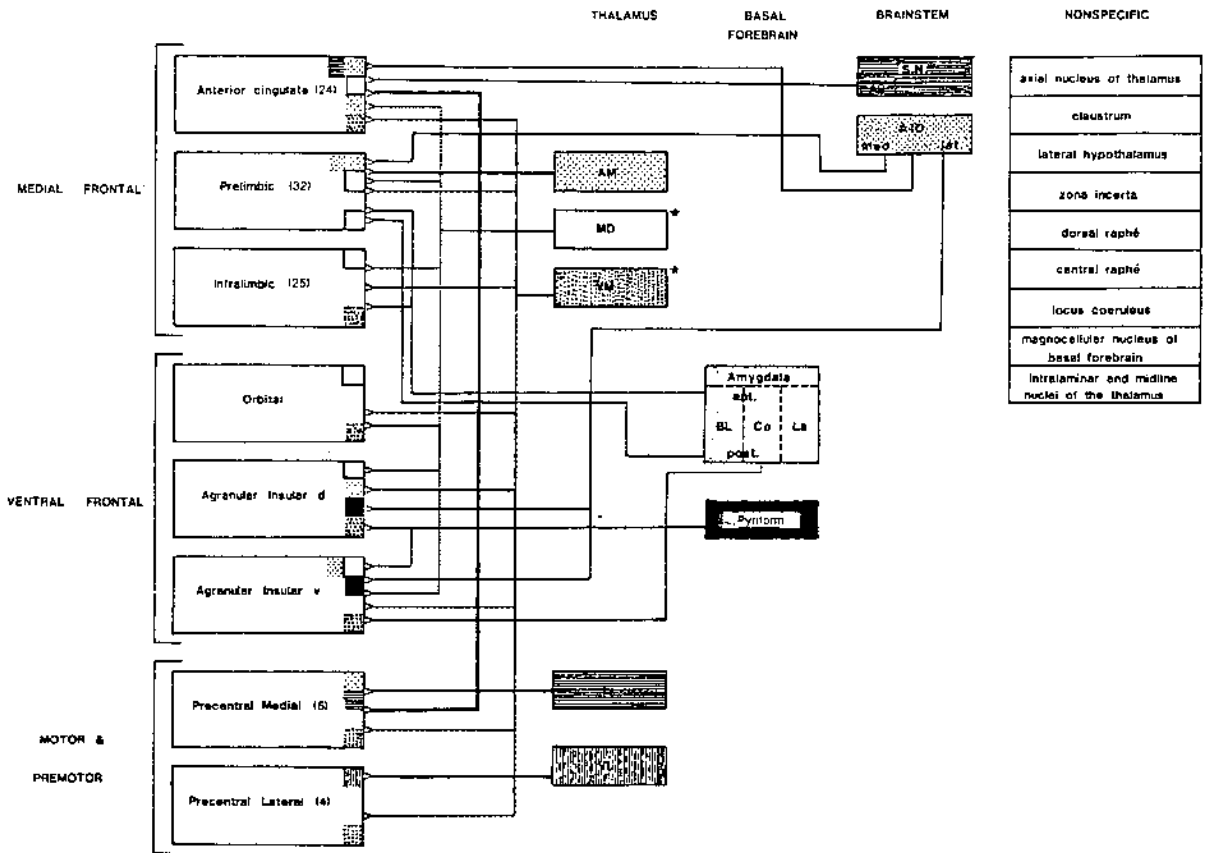


FIGURA 10

Representación esquemática de las aferencias de la corteza frontal. El área medial frontal se corresponde con la corteza prefrontal medial (áreas prelímbicas rostrales de Krettek y Price, 1977a) y el área ventral frontal es equivalente a la corteza prefrontal sulcal (áreas orbital e insular agranular de Krettek y Price, 1977a) (Tomada de Kolb, 1984).

2.1.- SUBSTRATOS NEUROANATOMICOS Y ELECTROFISIOLOGICOS.

Tras los estudios iniciales de Routenberg (- 1971) mostrando que ambas subdivisiones de la corteza - prefrontal soportan SS, una serie de investigaciones -- han tratado de dilucidar la participación de este área cortical en los substratos neurales de la SS cerebral.

Los estudios electrofisiológicos realizados - en rata y primate, han mostrado la activación de neuro- nas en ambas subdivisiones de la corteza prefrontal du- rante la SS de diferentes áreas cerebrales (Ito y Olds, 1971; Rolls y Cooper, 1973; Rolls, 1975; Mora et al., - 1980; Rolls et al., 1980). Concretamente, durante la SS del hipotálamo lateral, locus coeruleus, núcleo accum-- bens, amígdala y núcleo dorsomedial del tálamo. Esta ac- tivación es, en parte, reciproca ya que durante la SS - en la corteza orbitofrontal del primate se activan neu- ronas en hipotálamo lateral, amígdala, núcleo caudado y sustancia innominata (Burton et al., 1976; Rolls et al., 1980).

Los estudios histológicos han confirmado esta activación reciproca mostrando la existencia de conexio- nes tanto aferentes como eferentes entre las diferentes áreas que soportan SS. Así, Vives et al. (1983), utili- zando la técnica del transporte axonal retrógrado de la peroxidasa del rábano, mostraron que las neuronas de la corteza prefrontal reciben aferencias procedentes de nu- merosas áreas talámicas, hipotalámicas, mesencefálicas y pontinas. Recíprocamente, Dalssas et al. (1981) median- te la técnica del transporte axonal anterógrado con 35- S-metionina, mostraron que las neuronas existentes en -

puntos de SS de la corteza prefrontal envían eferencias a estas mismas áreas. Concretamente, se han descrito co ne xio nes re ci pro cas entre la CPM y las siguientes estruc turas que, en su mayoría, también soportan SS: corteza prefrontal sulcal, hipotálamo, zona incerta, amígdala, sustancia negra, área ventrotegmenal, núcleos del rafe, sustancia gris periacueductal, locus coeruleus y diversos núcleos talámicos incluyendo al núcleo dorsomedial del tálamo. No obstante, existen excepciones entre las que cabe destacar las conexiones con los núcleos caudado-putamen, cláustro, septum y núcleo accumbens, estruc turas con las que la corteza prefrontal sólo parece establecer conexiones eferentes.

Desde un punto de vista teórico, estos estudios han sugerido la existencia de tres elementos impor tan tes en la SS de la corteza prefrontal medial (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990). En primer lugar, las neuronas intrínsecas a dicha área cortical. En segundo lugar, las eferencias que originándose en dichas neuronas intrínsecas sinapsan con neuronas localizadas en di fe ren tes núcleos cerebrales. Y tercero, las terminales que, originándose en las neuronas localizadas en estos últimos núcleos sinapsan con neuronas intrínsecas a la CPM.

Las neuronas intrínsecas a la CPM, por tanto, envían aferencias y reciben las aferencias de las diferentes áreas cerebrales con las cuales esta estructura mantiene conexiones recíprocas. En consecuencia, estas neuronas podrían ser el elemento fundamental en la SS de la CPM. Efectivamente, dos estudios recientes han de mo strado esta hipótesis mostrando que la destrucción de las neuronas intrínsecas, mediante la microinyección de

ácido kaínico o iboténico, abole casi completamente la SS en este área cortical (Ferrer et al., 1985; Nassif et al., 1985). La abolición de la SS se mantiene tanto tras la inyección de anfetamina como tras el incremento de la intensidad de la estimulación (Ferrer et al., --- 1985; Mora y Ferrer, 1986). Los estudios histológicos - realizados mostraron la degeneración de los cuerpos neuronales con una clara pignosis e invasión glial del espacio extracelular (Ferrer et al., 1985; Nassif et al., 1985). De igual forma, la inyección de ácido kaínico en la otra subdivisión de la corteza prefrontal, la corteza prefrontal sulcal, también abole la SS en esta última área cortical (Gerfen y Clavier, 1981). Por tanto, las neuronas intrínsecas a ambas subdivisiones de la corteza prefrontal son fundamentales para la SS en dichas -- áreas corticales.

Siguiendo el mismo tipo de razonamiento, se - podría esperar que la lesión de cada uno de los núcleos que mantienen conexiones recíprocas con la corteza prefrontal deberían modificar la SS. Sin embargo, los efectos obtenidos dependen del área cerebral lesionada como ha sido expuesto en el apartado 1.4. Así, la lesión del locus coeruleus, núcleo accumbens, zona incerta, FPM-hipotálamo lateral, claustro o corteza prefrontal sulcal no modifican la SS en la corteza prefrontal medial (Corbett et al., 1982a; Ramirez et al., 1983; Ferrer, 1984; Robertson et al., 1986a; Cobo et al., 1989).

La lesión del núcleo caudado-putamen, núcleo dorsomedial del tálamo o amígdala basolateral, produce un descenso de la SS que se mantiene durante 3-6 días - dependiendo de la estructura (Vives et al., 1986; Ferrer et al., 1987). Así, mientras la lesión del núcleo caudado se recupera 4 días tras la lesión (Vives et al., ---

1986), la lesión de la amígdala basolateral o del núcleo dorsomedial del tálamo se recupera 7 días tras la lesión (Vives et al., 1986; Ferrer et al., 1987). Estudios anteriores, sin embargo, mostraron que la lesión del núcleo dorsomedial del tálamo, mayor aferencia subcortical no-dopaminérgica de la CPM, no modifica la SS en la CPM -- (Corbett et al., 1982a). Estas diferencias pueden explicarse, al menos en parte, en base a la diferente localización de los electrodos de estimulación en la CPM (Mora y Ferrer, 1986). Así, mientras en el estudio de Corbett et al. (1982) los electrodos parecen localizarse en las capas superficiales de la CPM, en el de Vives et al. (1986) se localizan en las capas profundas.

La lesión del área ventrotegmental o de sus proyecciones dopaminérgicas produce un descenso de la SS que se mantiene durante los 15-21 días de duración del experimento aún cuando existe una tendencia a la recuperación (Phillips y Fibiger, 1978; Vives et al., --- 1986). Efectivamente, Simon et al. (1979) observaron -- una recuperación de la tasa de SS transcurridas cuatro semanas desde la lesión. Sin embargo, persiste cierto déficit de la SS que puede observarse en la alteración de la curva de intensidad-frecuencia. Por otra parte, la deplección neonatal de dopamina con 6-OH-DA no modifica la SS en la CPM de animales adultos (Unemoto et al., 1984). De igual manera, la inyección de 6-OH-DA en la corteza prefrontal sulcal no modifica la SS en esta última área cortical (Gerfen y Clavier, 1981). Estos resultados sugieren que aún cuando las terminales dopaminérgicas juegan un papel en la SS de la corteza prefrontal, este papel no es exclusivo pudiendo otras vías con sus respectivos neurotransmisores compensar el déficit de dopamina (Mora y Ferrer, 1986).

Por último, la lesión de la vía prefrontocortical a nivel de cápsula externa produce una abolición de la SS que persiste durante los 17 días de duración del experimento (Cobo et al., 1989). Es interesante que la lesión de esta vía corticofugal, antes de penetrar en cápsula externa, produce un descenso de la SS que se recupera 22 días después de la lesión (Corbett et al., 1982a; Robertson et al., 1982a). Extrapolando estos últimos resultados, sería posible especular que las lesiones realizadas a nivel de cápsula externa también podrían recuperarse 4 semanas después de la lesión (Mora y Cobo, 1990).

Basandose en el hecho de que ninguna de las lesiones produce un descenso permanente de la SS, Mora y Ferrer (1986) han propuesto que la activación de varios núcleos interconectados entre sí (circuito complejo) puede ser la responsable de la SS en la CPM de la rata. De esta forma, tras la lesión de un único componente del circuito, el resto de las estructuras no dañadas pueden compensar el déficit producido sobre la SS (Mora y Ferrer, 1986). Concretamente, estos autores han sugerido la participación de varios circuitos complejos en la SS de la CPM (ver figura 11), destacando la importancia de dos de ellos:

1.- Corteza prefrontal medial-amígdala basolateral-núcleo dorsomedial de tálamo-corteza prefrontal medial.

2.- Corteza prefrontal medial-corteza entorrinal-área ventro tegmental-corteza prefrontal medial.

La participación del primer circuito en la SS de la CPM ha sido propuesta en base a tres hechos: primero, la corteza prefrontal medial, la amígdala basolateral y el núcleo dorsomedial del tálamo están recípro-

camente interconectados (Krettek y Price, 1977a,b; Divac et al., 1978; Beckstead, 1979; Dalssas et al., 1981; -- Sarter y Markowitsch, 1983a; Vives et al., 1983). Segundo, las tres estructuras soportan SS (Wurtz y Olds, --- 1963; Routenberg, 1971; Clavier y Gerfen, 1982). Tercero, mediante la técnica de la 2-deoxiglucosa, se ha detectado una elevada actividad metabólica en amígdala y núcleo dorsomedial del tálamo durante la SS en la CPM - (Yadin et al., 1983). El circuito formado por estas tres estructuras fué denominado por Livingston y Esbobar (- 1971) "circuito límbico basolateral" y ha sido involu-- crado en aprendizaje y memoria (Livingstone y Escobar, 1971; Sarter y Markowitsch, 1983b). Para dilucidar la - participación de dicho circuito en la SS, se realizaron lesiones simultáneas de amígdala basolateral y núcleo - dorsomedial del tálamo. Tras la lesión se observó un -- descenso de la SS mayor que el obtenido tras la lesión simple de cada una de dichas estructuras (Ferrer et al., 1987). Estos datos han sugerido que este circuito podría jugar un papel modulador en la SS de la CPM (Ferrer et al., 1987).

En relación al segundo circuito, se ha observado la existencia de una interconexión recíproca entre las tres estructuras (corteza prefrontal medial, corteza entorrinal y área ventrotegmenal), y todas ellas so portan SS (Routenberg, 1971; Collier et al., 1977; Beckstead, 1979; Dalssas et al., 1981; Vives et al., 1983). Igualmente, se ha observado una alta actividad metabóli ca en la corteza entorrinal, una de las áreas termina- les de la vía prefronto-cortical, durante la SS en la - corteza prefrontal medial (Yadin et al., 1983). Además, tanto la lesión de esta vía cortico-cortical a varios -

niveles (cápsula externa y corteza entorrinal) como la lesión de las proyecciones dopaminérgicas procedentes - del área ventrosegmental producen un descenso de la SS (Corbett et al., 1982a; Robertson et al., 1986a; Vives et al., 1986; Cobo et al., 1989). Todos estos datos sugirieron la participación de este circuito en la SS de la CPM.

No obstante, tampoco tras la lesión combinada de las estructuras de un circuito complejo (ej: el circuito límbico basolateral) se produce un descenso permanente de la SS (Ferrer et al., 1987). Esta observación ha sugerido que durante la SS de la corteza prefrontal no se activa un único circuito complejo sino varios (Mora y Cobo, 1990). De esta forma, tras la lesión de uno o varios núcleos, el resto de los circuitos no dañados con sus respectivos neurotransmisores pueden compensar el déficit (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990).

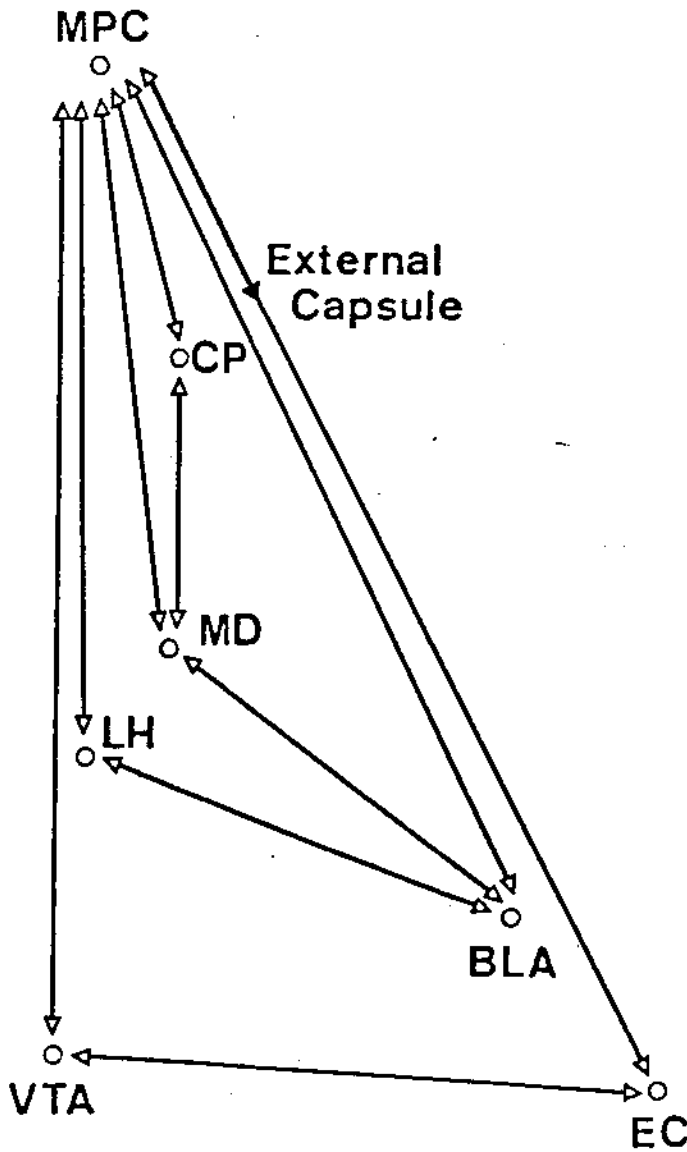


FIGURA 11 .- Circuitos presuntamente envueltos en la SS de la corteza prefrontal medial (Tomado de Mora y Cobo, 1990). Abreviaturas: BLA, amígdala basolateral; CP, caudado-putamen; EC, corteza entorrinal; LH, hipotálamo lateral; MD, núcleo dorsomedial del tálamo; MPC, corteza prefrontal medial; VTA, área ventrotegmental.

2.2.- SUBSTRATOS NEUROQUÍMICOS Y NEUROFARMACOLÓGICOS.

La corteza prefrontal contiene la mayoría de los neurotransmisores localizados en el sistema nervioso central, incluyendo monoaminas, péptidos y aminoácidos (Mora y Ferrer, 1986). Igualmente, se ha demostrado la existencia de múltiples receptores opiáceos y de receptores para neurotensina (Willians y Zieglgansberger, 1981; Quirion et al., 1982) así como de receptores glutamérgicos NMDA (Cotman et al., 1987). Además, se ha descrito coexistencia de varios neurotransmisores en las mismas terminales sinápticas corticales (Docherty et al., 1987) y la interacción de péptidos con dopamina, acetilcolina y aminoácidos (Bunney, 1987; Docherty et al., 1987; Lindfors et al., 1987).

En los últimos años, se ha mostrado que algunos de los neurotransmisores presentes en la corteza prefrontal participan en la SS de este área del cerebro (Mora y Ferrer, 1986). En concreto, evidencias neurofarmacológicas y neuroquímicas sugieren que la dopamina, la acetilcolina, los péptidos opiáceos y la sustancia P forman -- parte del sustrato neuroquímico de la SS en la CPM (Mora, 1978; Mora et al., 1980; Ferrer et al., 1983; Vives y Mora, 1986; Ferrer et al., 1987). Por el contrario, otros neurotransmisores como la noradrenalina, serotonina y colecistokinina no parecen participar en la SS de esta área cortical aún cuando participan en la SS de otras áreas cerebrales (Ramirez et al., 1983; Shaw et al., 1984; Ferrer et al., 1988). Estos estudios han sido revisados por Mora y Ferrer (1986) y recientemente por Mora y Cobo --- (1990).

2.2.1.- DOPAMINA Y NORADRENALINA.

La corteza prefrontal en sus dos subdivisiones (medial y sulcal) recibe terminales dopaminérgicas y noradrenérgicas procedentes del área ventro tegmental y del locus coeruleus respectivamente (Ungerstedt, 1971; Thierry et al., 1973; Berger et al., 1976; Thierry et al., 1976; Kalsbeek, 1989). Las fibras originadas en estas áreas constituyen el sistema mesocortical dopaminérgico y el sistema noradrenérgico dorsal (Ungerstedt, 1971). Las terminales de estas fibras en la corteza prefrontal medial presentan una sistematización topográfica definida aún cuando, en general, todas las capas reciben tanto terminales dopaminérgicas como noradrenérgicas (Fuxe et al., 1974; Lindvall et al., 1974; Berger et al., 1976; Thierry et al., 1976). Así, las terminales dopaminérgicas se localizan fundamentalmente en las capas profundas (V y VI) a diferencia de las noradrenérgicas que se concentran en las capas más superficiales (I-III) (Berger et al., 1976). Recientemente, se han realizado estudios inmunocitoquímicos y autorradiográficos para describir el origen y terminación de las vías catecolaminérgicas, particularmente en relación a la dopamina (Van Eden et al., 1987; Doucet et al., 1988; Kalsbeek, 1989).

Estudios neurofarmacológicos iniciales sugirieron la posibilidad de que la dopamina estuviese involucrada en la SS de la corteza prefrontal (Mora et al., 1976b). Estos estudios mostraron que antagonistas de los receptores dopaminérgicos, tales como el spiroperidol, haloperidol y pimozide, producen una inhibición dosis-relacionada de la SS en la corteza orbitofrontal del mono rhesus. Efectos similares se obtuvieron por los mismos -

autores en la corteza prefrontal medial de la rata (Mora, 1978). La administración subcutánea de apomorfina, un -- agonista de los receptores dopaminérgicos, también produce un descenso dosis relacionado de la SS tanto en la corteza prefrontal de la rata (Mora et al., 1976a) como en la corteza orbitofrontal del mono rhesus (Phillips et al., 1979).

Otro fármaco empleado en los estudios farmacológicos es la d-anfetamina, droga que produce liberación y bloquea la recaptación de dopamina. Concretamente, se ha mostrado que la administración de anfetamina produce una facilitación de la SS en la corteza prefrontal medial, aún cuando esta facilitación es menor que en otras áreas cerebrales como el hipotálamo lateral (Goodall y Carey, 1975; Robertson y Mogenson, 1979; Robertson et al., 1981; Franklin y Robertson, 1982; Hand y Franklin, 1983).

En segundo lugar, se ha observado que los agonistas dopaminérgicos (apomorfina) así como la L-dopa y la anfetamina, inhiben la tasa de disparo espontáneo en neuronas localizadas en áreas de la corteza prefrontal - que soportan SS (Mora et al., 1976c; Phillips y Fibiger, 1978). Esta inhibición puede ser bloqueada inyectando -- previamente un antagonista dopaminérgico (Mora et al., - 1976c). Estos resultados fueron confirmados por Bunney y Aghajanian (1976) mediante la aplicación iontoforética - de dopamina y apomorfina en la corteza prefrontal de la rata. Más recientemente, Ferron et al. (1984) han mostrado que la estimulación "in vivo" del área ventrotegmen--tal, origen de las terminales dopaminérgicas de la CPM, también disminuye la tasa de disparo espontáneo de las - neuronas de la corteza prefrontal. Este efecto es inhibido por el sulpiride, un antagonista dopaminérgico (Thie--rry et al., 1986).

La evidencia definitiva mostrando que la dopamina juega un papel en la SS de la CPM fué obtenida por Mora y Myers (1977) mediante técnicas neuroquímicas. Estos autores han mostrado que la liberación de dopamina endógena aumenta más del 100% durante la SS en la corteza prefrontal medial (Mora y Myers, 1977; Myers y Mora, 1977; Mora, 1978).

Estudios farmacológicos más recientes apoyan la participación de la dopamina en la SS y sugieren que los receptores envueltos en la mediación dopaminérgica son los receptores D_1 pero no los receptores D_2 (Ferrer et al., 1983) aún cuando ambos tipos de receptores están presentes en esta área cortical (Tassin et al., 1978; Iversen et al., 1980). Así, la administración tanto intraperitoneal como intracortical de agonistas y antagonistas D_2 no modifica la SS en la CPM. Sin embargo, la microinyección de fármacos que actúan frente a los dos tipos de receptores (D_1 - D_2) produce una atenuación selectiva de la SS (Ferrer et al., 1983). Estos estudios han sido confirmados recientemente empleando un bloqueante específico de los receptores D_1 , SCH-23390 (Iorio, 1981; Hyttel, 1983; Sabater et al., 1989).

Los resultados obtenidos tras los estudios farmacológicos y neuroquímicos sugieren la participación de la dopamina en la SS de la CPM. Estos resultados, además, apoyan los datos obtenidos tras los estudios neuroanatómicos (Phillips y Fibiger, 1978; Vives et al., 1986). Efectivamente, estos últimos estudios han mostrado que tanto la lesión del área ventrotegmental, origen del sistema mesocortical dopaminérgico, como la deplección de dopamina producida tras la lesión neurotóxica de dicho sistema, producen un descenso de la SS que se mantiene durante 21 días.

Es interesante destacar, sin embargo, que transcurridas 4 semanas tras la lesión se observa una total recuperación de la tasa de autoestimulación (Simon et al., 1979). Igualmente, la deplección neonatal de dopamina -- con 6-OH-DA no modifica la SS en la CPM de animales adultos (2-3 meses tras la lesión) (Unemoto et al., 1984). Estos datos sugieren que aún cuando la dopamina participa en los substratos neuroquímicos de la SS en la CPM, no juega un papel exclusivo pudiendo otros neurotransmisores compensar el déficit de dopamina transcurrido cierto tiempo tras la lesión (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990).

En relación a la noradrenalina, se ha mostrado que la administración tanto de agonistas como de antagonistas α y β adrenérgicos (clonidina, isoproterenol, fenoxibenzamina y propanolol) no produce ningún efecto sobre la SS en la CPM (Ramirez et al., 1983). Igualmente, la lesión del locus coeruleus, origen de la vía noradrenérgica dorsal, no modifica la SS en dicha área cortical -- (Ramirez et al., 1983). Estos datos han sugerido que la noradrenalina no participa en el substrato neuroquímico de la SS en este área del cerebro.

2.2.2.- SEROTONINA Y ACETILCOLINA.

En la corteza prefrontal también se ha descrito la existencia de terminales serotoninérgicas y acetilcolinérgicas (Ungerstedt, 1971; Emson, 1978; Melusam et al., 1983; Mayo et al., 1984; Wainer et al., 1984). El origen de las terminales serotoninérgicas son los núcleos del rafe dorsal y ventral (Breese y Cooper, 1975). La inervación acetilcolinérgica, por su parte, procede del núcleo basal de Meynert (Cuello y Sofroniew, 1984) fundamentalmente del área Ch₄ que incluye parte de la sustancia innominata (Melusam et al., 1983; Mayo et al., 1984; Wainer et al., 1984). La acetilcolina se localiza preferentemente en las capas profundas de la corteza prefrontal coincidiendo con las terminales dopaminérgicas (Emson, 1978). La interacción dopamina-acetilcolina, además, ha sido involucrada en la SS de otras áreas del cerebro (Stephens y Herberg, 1979; Wishart y Herberg, 1979).

Los estudios farmacológicos realizados han sugerido que la serotonina no participa en la SS de la corteza prefrontal medial, aún cuando forma parte de los substratos neuroquímicos de la SS en otras áreas cerebrales. Concretamente, Ramírez et al. (1983) han mostrado que la deplección cerebral de serotonina, producida por la paraclorofenilalanina, no modifica la SS en la CPM.

La acetilcolina, por el contrario, sí ha sido involucrada en la SS de la corteza prefrontal medial (Mora et al., 1980b; Vives y Mora, 1986). Así, la administración de escopolamina, bloqueante de los receptores muscarínicos, produce un descenso dosis-relacionado de la SS en este área cortical (Mora et al., 1980b). Este

descenso no se acompaña de alteraciones motoras del animal. Este mismo efecto también se observó tras la administración de otro antagonista muscarínico, el dexetimide, y tras la inyección de un agonista muscarínico, la pilocarpina (Mora et al., 1980b; Vives y Mora, 1986). Interesantemente, no se encontraron efectos tras la inyección de agonistas o antagonistas nicotínicos (Vives y Mora, 1986). Estos datos han sugerido que la participación de la acetilcolina en la SS de la CPM está mediada por los receptores muscarínicos.

No obstante, a pesar de la especificidad de los efectos obtenidos, es posible que este neurotransmisor no participe de forma directa en la SS de la corteza prefrontal ya que las inyecciones se realizaron a nivel periférico (Mora y Cobo, 1990). De esta manera, la droga puede actuar en otras muchas estructuras cerebrales además de la corteza prefrontal y ejercer sus efectos de forma indirecta. Por ello, tras estos estudios sólo es posible inferir un papel indirecto para la acetilcolina, concretamente a través de receptores muscarínicos, en la SS de la corteza prefrontal medial (Mora Y Cobo, 1990).

2.2.3.- PEPTIDOS NEUROTRANSMISORES.

Estudios recientes han mostrado la existencia en la corteza prefrontal de neuronas y terminales que -- contienen péptidos como la sustancia P, colecistokinina, neurofisina, encefalinas, somatostatina, bombesina, VIP y neuropéptido Y (Cuello y Kanasawa, 1978; Emson, 1978; Emson et al., 1979; Stengaard-Pedersen y Larson, 1981; - Inagaki et al., 1982; McGregor et al., 1982; Phillipson y Gonzalez, 1983; Sakanaka et al., 1983; Foster y Shulzberg, 1984; De Quidt y Emson, 1986; Lewis et al., 1986; Kritzer et al., 1987). Igualmente, se ha descrito la presencia de múltiples receptores opiáceos así como de re--ceptores para neurotensina (Willians y Zieglgansberger, 1981; Quirion et al., 1982). No obstante, el origen de - los diferentes sistemas peptidérgicos todavía no está -- bien definido.

El hallazgo en la corteza prefrontal de estos - péptidos neurotransmisores, abrió un nuevo campo en relación a los substratos neuroquímicos de la SS en este área cortical. Concretamente, los estudios neurofarmacológicos realizados se han centrado en tres péptidos: colecistokinina, sustancia P y péptidos opiáceos. Estos estudios han mostrado que la colecistokinina no participa en la SS de la CPM. Los péptidos opiáceos pueden jugar un papel, aunque indirecto, mientras que la sustancia P sí está involucrada en la SS de la corteza prefrontal medial (Shaw - et al., 1984; Ferrer et al., 1988).

2.2.3.1.- PEPTIDOS OPIACEOS.

El primer estudio sobre los efectos de los péptidos opiáceos en relación a la SS en la corteza prefrontal fué realizado por Lorens (1976b). Este estudio mostró que la inyección sistémica de morfina posee un efecto bifásico con un componente inicial inhibitorio no específico (impedimento motor) seguido de una facilitación específica de la SS. Estudios posteriores realizados por Shaw et al. (1984), utilizando inyecciones intraventriculares de morfina, confirman estos resultados. Este efecto facilitatorio puede ser revertido tras la administración de naloxona, antagonista de los receptores opiáceos (Shaw et al., 1984). Sin embargo, la microinyección intracerebral de morfina en la propia corteza prefrontal no tiene efectos sobre la SS de dicha área cortical (Shaw et al., 1984).

Igualmente, mientras la administración sistémica de naloxona produce un descenso significativo de la SS en la CPM (Franklin y Robertson, 1982), la microinyección intracerebral de dicha droga no modifica la SS en este área cerebral (Shaw et al., 1984).

Estos resultados sugieren que los efectos producidos tanto por la morfina como por la naloxona, no se deben a su actuación directa a nivel de la corteza prefrontal sino, posiblemente, a su actuación sobre las neuronas de otras áreas cerebrales (Shaw et al., 1984). El área ventrotegmental provee de dopamina a la corteza prefrontal y en ella se ha descrito una interacción dopamina péptidos opiáceos (Broekkamp et al., 1979; Kelley et al., 1980). Además, la microinyección de morfina en AVT

facilita la SS en dicha área cerebral (Rompre y Wise, -- 1989a,b). En base a estos datos se ha sugerido que los - efectos de los péptidos opiáceos pueden ser debidos a su actuación sobre las neuronas del área ventrotegmental -- (Shaw et al., 1984; Mora y Cobo, 1990).

2.2.3.2.- COLECISTOKININA Y SUSTANCIA P.

La corteza prefrontal es posiblemente el área cortical que posee la más alta concentración de sustan-- cia P (Cuello y Kanazawa, 1978). Este péptido se localiza, al igual que la dopamina y la acetilcolina, en las - capas corticales profundas (V y VI) (Emson, 1978; Sakana- ka et al., 1983; Shults et al., 1984).

Estos datos sugirieron la posible participación de la sustancia P en la SS de este área cortical. Intere-- santemente, la microinyección tanto intraventricular co- mo intracortical de dicho péptido produce un descenso de la SS en la CPM (Ferrer et al., 1988). Este descenso pa- rece ser selectivo ya que similares inyecciones no modi- ficaron la actividad motora espontánea de los animales - ni la SS en la corteza prefrontal contralateral a la in- yección. Estos datos indican que la sustancia P partici- pa en la SS de esta área cortical (Ferrer et al., 1988).

Actualmente, es conocida la interacción de sus- tancia P y dopamina en estructuras cerebrales donde es-- tán presentes ambos neurotransmisores (Cheramy et al., - 1978; Eison et al., 1982; Starr, 1982) y se ha sugerido que la sustancia P juega un papel modulador sobre las neu- ronas del sistema mesocortical dopaminérgico (Elliot et

al., 1986). Además, como se ha mencionado anteriormente, ambos neurotransmisores coexisten en las mismas capas -- corticales (Emson, 1978; Sakanaka et al., 1983). Estos - datos han sugerido la existencia de una posible interac- ción sustancia P-dopamina en relación a la SS en la CPM (Mora y Ferrer, 1986; Ferrer et al., 1988).

La corteza prefrontal posee una alta densidad de colecistokinina que se localiza fundamentalmente en - las capas III y IV, aún cuando se distribuye por todas - las capas corticales ya que se ha descrito su localiza-- ción en interneuronas (Stengaard-Pedersen y Larson, 1981; Kritzer et al., 1987). Además, se ha descrito una inter- acción CCK-dopamina tanto a nivel subcortical (Hökfelt - et al., 1980; Govoni et al., 1982) como en la propia cor- teza prefrontal (Fukamachi y Takahashi, 1988).

Sin embargo, la microinyección tanto intraven- tricular como intracortical de CCK-8 no modifica la SS - en la CPM (Ferrer et al., 1988). Las dosis empleadas en este estudio producen tanto efectos bioquímicos como con- ductuales (Myers y McCaleb, 1981; Crawley et al., 1985). Igualmente, dosis similares producen efectos sobre la SS de otras áreas del cerebro (Fekete et al., 1983). Todos estos datos sugieren que la CCK no participa en la SS de la corteza prefrontal medial.

Es interesante destacar que, aún cuando se ha sugerido un papel modulador para la CCK en conductas re- lacionadas con la dopamina (Crawley et al., 1985), este papel sólo se observa en áreas donde ambos neurotransmi- sores coexisten en la misma neurona. Precisamente, el sis- tema mesocortical dopaminérgico que provee de dopamina a la corteza prefrontal no posee este tipo de coexistencia (Hökfelt et al., 1980; Marley et al., 1982). Estudios re

cientes, además, han mostrado que la CCK actúa sobre los receptores dopaminérgicos D_2 pero no sobre los D_1 (Mashal et al., 1983) y, como hemos mencionado con anterioridad, los efectos de la dopamina sobre la SS de la CPM están mediados por los receptores D_1 (Ferrer et al., 1983). Todos estos datos apoyan la no participación de la colecist_u tokenina en la SS de la CPM (Ferrer et al., 1988).

2.2.4.- AMINOACIDOS NEUROTRANSMISORES.

Los aminoácidos presuntamente neurotransmisores (fundamentalmente GABA, aspártico y glutámico) también están presentes en la corteza prefrontal (Fonnum et al., 1981a,b; Peinado et al., 1984; Esclapez et al., 1987; Cotman et al., 1987; Schwartz et al., 1988). El GABA se ha localizado en interneuronas inhibitorias (Esclapez et al., 1987; Schwartz et al., 1989) mientras -- que los aminoácidos excitatorios (aspártico y glutámico) parecen localizarse fundamentalmente en las neuronas piramidales de mediano y gran tamaño (Dinopoulos et al., 1989; Dorí et al., 1989). Actualmente se conoce la existencia de una gran cantidad de vías corticofugales posiblemente mediadas por aminoácidos acídicos (Cotman et al., 1987). Sin embargo, el origen de las terminales -- glutamérgicas de la corteza prefrontal no es bien conocido. En este sentido, sólo se ha descrito la existencia de terminales procedentes de la corteza contralateral y del tálamo (Fonnum et al., 1981a,b; Fonnum, 1984; Peinado y Mora, 1986; Cotman et al., 1987) (ver fig. 7 -- pag. 53).

En cuanto a la distribución por capas, se ha mostrado que las neuronas gabérgicas se localizan fundamentalmente en las capas II y VI (Esclapez et al., 1987) mientras que las neuronas glutamérgicas se localizan -- fundamentalmente en la capa V (Dinopoulos et al., 1989). Precisamente, las terminales que contiene dopamina, acetilcolina y sustancia P así como receptores glutamérgicos NMDA poseen una distribución similar concentrándose en las capas profundas de la corteza prefrontal (Emson,

1978; Tassin et al., 1978; Sakanaka et al., 1983; Cotman et al., 1987; Dinopoulos et al., 1989; Dori et al., 1989). Por otra parte, la corteza prefrontal es una de las áreas corticales con mayor densidad de receptores - NMDA (Cotman et al., 1987) y, estos receptores han sido implicados en conducta, aprendizaje y memoria (Koek et al., 1986; Morris et al., 1986).

Todos estos datos sugirieron la hipótesis de que los aminoácidos acídicos podrían jugar un papel en la SS de la CPM. El objeto de la presente Tesis es, por tanto, investigar si los aminoácidos acídicos (particularmente el ácido glutámico) participan en el sustrato neuroquímico de la SS en la corteza prefrontal medial de la rata. Para ello, se han empleado tanto técnicas neurofarmacológicas (microinyección intraventricular e intracerebral de antagonistas de los receptores de los aminoácidos acídicos: NMDA, kaínico y quisquálico) como técnicas neuroquímicas (perfusión intracerebral "in vivo" "push-pull" y cromatografía líquida de alta presión).

3.- RESUMEN Y PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION PRESENTADA EN ESTA TESIS DOCTORAL.

El propósito de la presente investigación -- fué dilucidar la participación de los aminoácidos acídicos en el substrato neuroquímico de la SS en la corteza prefrontal medial de la rata.

Con este fin, se escogieron las técnicas idóneas que permitieron llevar a cabo la investigación --- propuesta. Estas técnicas, descritas ampliamente en la sección de Material y Métodos incluyen:

- 1.- Técnicas de estimulación eléctrica del cerebro.
- 2.- Registro de la actividad motora espontánea.
- 3.- Técnica de microinyección intraventricular e - intracortical.
- 4.- Técnicas de perfusión intracerebral "in vivo" "push-pull".
- 5.- Análisis de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) aclopada a detector de fluorescencia.
- 6.- Técnicas histológicas.

Para llevar a cabo el objetivo propuesto se - han realizado dos bloques de experimentos:

- 1.- Estudio dosis-efecto de la administración - de antagonistas de los receptores de los aminoácidos acídicos sobre la autoestimulación en - la corteza prefrontal medial.
- 2.- Estudio de los perfiles de aminoácidos liberados en la corteza prefrontal medial durante la autoestimulación.

En los últimos años, un gran número de estudios han investigado los substratos neuroquímicos de la autoestimulación en la corteza prefrontal (Mora y Ferrer, 1986), un área cortical relacionada con memoria, motivación y aprendizaje (Kolb, 1984) .

Así, aún cuando se ha demostrado la localización en este área cortical de dopamina, noradrenalina, acetilcolina, serotonina y péptidos neurotransmisores (colecistokinina, péptidos opiáceos y sustancia P), estudios neurofarmacológicos y neuroquímicos sugieren que sólo la dopamina, la acetilcolina, los péptidos opiáceos y la sustancia P participan en la SS de la corteza prefrontal medial (Mora y Ferrer, 1986) .

El estudio de los aminoácidos neurotransmisores es más reciente. Así, se ha demostrado que la corteza prefrontal medial es un área muy rica en terminales glutamérgicas (Fonnum, 1984; Esclapez et al., 1987) y se ha sugerido la existencia de vías prefronto-corticales mediadas por aminoácidos acídicos (Fonnum, 1984; Fonnum et al., 1981a; Peinado y Mora, 1986). Del mismo modo, se ha mostrado que la corteza prefrontal, junto con las cortezas cingular y piriforme, es el área cortical con mayor densidad de receptores NMDA (Cotman et al., 1987).

Es interesante destacar, además, la coexistencia de dopamina, acetilcolina, sustancia P y receptores glutamérgicos (NMDA, kaínico y quisquálico) en las mismas capas corticales (Emson, 1978; Tassin et al., 1978; Sakanaka et al., 1983; Cotman et al., 1987). Así como la implicación de los receptores glutamérgicos en aprendizaje, memoria y conducta (Koek et al., 1986; Morris et al., 1986; Cotman e Iversen, 1987).

Estos datos sugirieron la posibilidad de que los aminoácidos acídicos (ácidos aspártico y glutámico) estuvieran envueltos en la SS de la corteza prefrontal medial. Con objeto de confirmar o descartar esta hipótesis se realizaron microinyecciones tanto intraventriculares como intracorticales de γ -D- glutamilglicina, -- bloqueante de tres de los cuatro tipos conocidos de receptores de los aminoácidos acídicos (NMDA, Kaínico y quisqualico) (McGeer y McGeer, 1981; Davies et al., --- 1981; Watkins y Olverman, 1987). La microinyección tanto intraventricular como intracortical de dicho fármaco produce un descenso dosis-relacionado de la SS en la - corteza prefrontal medial. Similares microinyecciones - no producen alteraciones significativas de la actividad motora espontánea de los animales ni de la SS en la cor_{te}za prefrontal contralateral a la inyección. Estos datos sugieren que los aminoácidos acídicos participan en la SS de la CPM.

Actualmente, se sabe que las acciones de los aminoácidos acídicos pueden estar mediadas, al menos, - por cuatro tipos diferentes de receptores (Watkins, -- 1981; Surtees y Collins, 1985; Cotman e Iversen, 1987):

- Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).
- Receptores Kainato (KA).
- Receptores quisqualato (QA).
- Receptores L-2-aminofosfonobutirato (L-AP-4).

Los tres primeros tipos de receptores (NMDA, KA y QA) han sido localizados en la corteza prefrontal (Cotman et al., 1987). Dado que la γ -D-glutamilglicina actúa frente a estos tres tipos de receptores, los siguientes experimentos trataron de dilucidar si el efecto

obtenido estaba mediado por uno, dos o los tres tipos de receptores. Para ellos, se emplearon antagonistas específicos frente a cada tipo de receptor.

Los antagonistas específicos de los receptores NMDA han sido ampliamente estudiados en los últimos años (Cotman e Iversen, 1987; Kemp et al., 1987). Así, se ha descrito que sobre los receptores NMDA actúan gran cantidad de sustancias existiendo tanto antagonistas competitivos como no competitivos. Entre los antagonistas competitivos se encuentra el 2-amino-5-fosfonovalerato que ha sido muy utilizado en los últimos años (Morris et al., 1986; Cotman e Iversen, 1987; Rothman y Olney, 1987). La microinyección tanto intraventricular como intracortical de 2-amino-5-fosfonovalerato produce un descenso significativo de la SS en la corteza prefrontal medial de la rata. Similares inyecciones no producen modificaciones significativas de la actividad motora de los animales ni de la SS en la corteza contralateral no inyectada. Estos datos sugieren la participación de los receptores NMDA en los substratos neuroquímicos de la SS en la CPM.

Los antagonistas de los receptores de KA y QA son menos conocidos. Así, aún cuando se sabe que tanto el γ -D-glutamilaminometilsulfonato (GAMS) como la γ -D-glutamiltaurina (Glu-Tau) ejercen su acción preferentemente frente a los receptores KA y QA, no existen antagonistas selectivos que permitan distinguir entre sí ambos tipos de receptores (Watkins y Olverman, 1987; Cotman e Iversen, 1987). El antagonista KA-QA empleado en estos experimentos ha sido la γ -D-glutamiltaurina. La administración intraventricular de γ -D-glutamiltaurina produce un descenso dosis-relacionado de la SS en la

CPM. No obstante, este descenso se acompaña de modificaciones significativas de la actividad motora espontánea de los animales. Además la microinyección intracortical de γ -D-glutamiltaurina no produce efectos sobre la SS en dicha área cortical. Estos datos sugieren que los receptores de kainico y quisqualico no están envueltos en los substratos neuroquímicos de la SS en la CPM de la rata. Por tanto, la participación de los aminoácidos acídicos en la SS de este área cortical parece estar medida exclusivamente por los receptores NMDA.

Una vez dilucidada mediante técnicas neurofarmacológicas la participación de los aminoácidos acídicos en la SS de la CPM, se diseñó el siguiente grupo de experimentos cuyo objetivo fué estudiar los perfiles de aminoácidos liberados en la corteza prefrontal medial durante la SS de dicha área cortical. Ello hizo preciso el montaje previo de las técnicas de perfusión intracerebral "in vivo" "push-pull" y de análisis de aminoácidos, mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a detector de fluorescencia.

Los estudios neuroquímicos han mostrado que la estimulación eléctrica de la CPM a igual intensidad y frecuencia que la de autoestimulación (0.3 mA de intensidad y 100 Hz de frecuencia) produce un descenso de los niveles endógenos de glutámico. Similares resultados han sido obtenidos tras la estimulación eléctrica de la CPM a la misma frecuencia y doble intensidad (0.6 mA). Sin embargo, no se obtuvieron modificaciones de los niveles endógenos de aminoácidos a la intensidad de 0.15 mA. A esta última intensidad el animal no se autoestimula.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que - los aminoácidos acídicos, particularmente el ácido glutámico, forman parte de los substratos neuroquímicos de la SS en la corteza prefrontal medial de la rata.

MATERIAL Y METODOS

1.- ANIMALES.

Los animales empleados son ratas adultas machos de la raza Wistar, de un peso comprendido entre 250 y 320 grs., suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Granada. Dichas ratas se mantuvieron aisladas, durante toda la experimentación, en jaulas individuales situadas en el interior de una habitación con un fotoperiodo de 12 horas y una temperatura de 20-25°C. Tanto la comida como la bebida se suministran "ad libitum".

2.- MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS.

2.1.- REALIZACION DE IMPLANTES CEREBRALES.

Todos los implantes empleados en la realización de la presente Tesis Doctoral constan de electrodos para estimulación eléctrica y cánulas guía.

El tamaño y localización de las cánulas guía --varía según se utilizen para estimulación química (estudios neurofarmacológicos) o para obtención de perfundidos intracerebrales "in vivo" (estudios neuroquímicos). Por ello, se detallan en primer lugar los implantes empleados para estimulación eléctrica y posteriormente se describe el acoplamiento de cánulas para estimulación química o para perfusión "in vivo".

2.1.1.- IMPLANTES PARA ESTIMULACION ELECTRICA.

La estimulación eléctrica del cerebro se realiza mediante electrodos monopolares. El material utilizado en la construcción de los implantes con electrodos monopolares es el siguiente:

- alfileres entomológicos inoxidables de 0.25 mm de diámetro.
- armazón de polivinilo aislante Amphenol.
- barniz tixotrópico. Blundell-Permoglaze ltd.
- conectores hembra Amphenol 220-S02.
- resina Araldit. Ciba-Geigy.

El procedimiento de construcción es el siguiente: Tras doblar en ángulo recto dos alfileres entomológicos - por dos veces consecutivas, se introducen en ambos conecto-

res hembra y se unen a ellos por presión. Un tercer conector se suelda con estaño a un cable fino de acero inoxidable y se utiliza como polo de referencia (tierra). Posteriormente, los tres conectores se introducen en un armazón de polivinilo aislante (ver fig. 12).

La longitud y la distancia existente entre los electrodos no es fija sino que depende del área cerebral en la que éstos se implantan. Los electrodos implantados en la corteza prefrontal medial poseen una longitud de 5 mm. y una separación de 1,6 mm. Una vez reguladas estas medidas, se aseguran colocando Araldit en la parte del armazón de polivinilo en contacto con los electrodos.

Una vez solidificado el Araldit y fija la separación, los electrodos se recubren con dos capas de barniz tixotrópico aislante.

Previamente a la intervención quirúrgica, se descubre la punta de los electrodos en una longitud de 0,3 mm. y se comprueba su correcto aislamiento utilizándolos como cátodo en una cuba electrolítica. El electrodo se considera adecuadamente aislado cuando la formación de hidrógeno ocurre exclusivamente en la porción descubierta del electrodo y, por tanto, solo permite el paso de corriente eléctrica al tejido cerebral en su extremo.

2.1.2.- IMPLANTES PARA ESTIMULACION QUIMICA

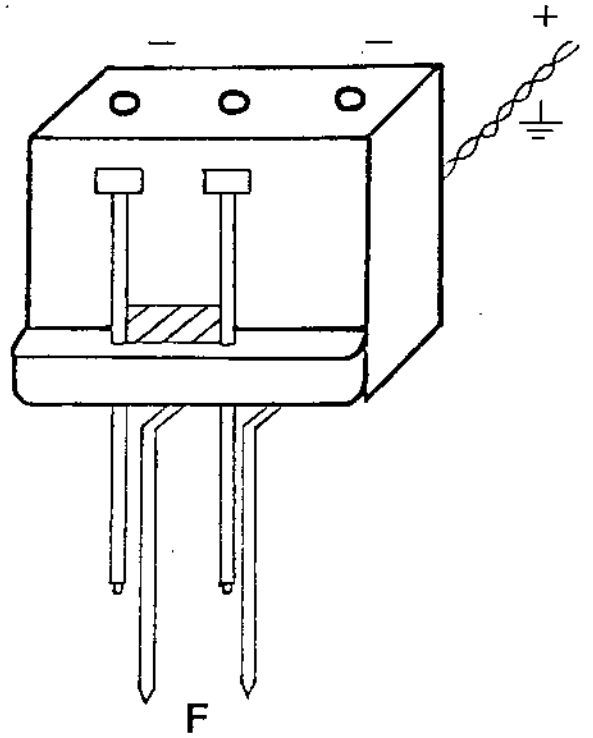
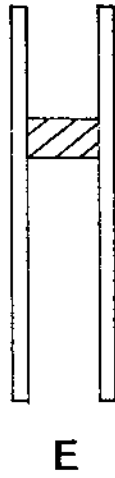
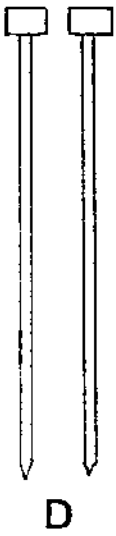
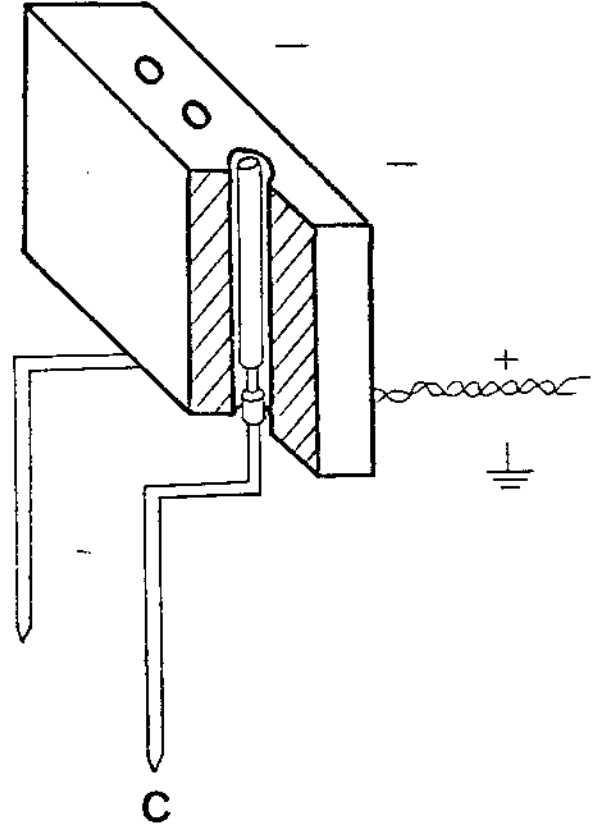
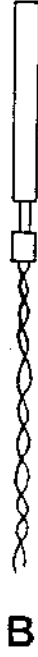
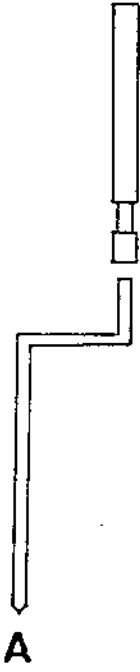
Los implantes empleados para estimulación química constan de un sistema de electrodos para estimulación eléctrica y dos cánulas guía de acero inoxidable de 10 mm. de longitud que permiten la microinyección de fármacos.

El tamaño y separación de las cánulas guía es diferente para los grupos intraventriculares y para los gru-

FIGURA 12

IMPLANTE DE ELECTRODOS (mitad superior). A: Electrodo y conector. B: Conector unido a tierra. C: - Electrodo y tierra introducidos en el soporte aislante. Los electrodos van unidos a los conectores de los extremos. El conector central va unido a tierra (polo positivo). La sección muestra la localización de uno de los conectores en el interior del armazón de polivinilo aislante.

IMPLANTE DE ELECTRODOS Y CANULAS (mitad inferior). D: Fiadores. E: Cánulas unidas a una distancia de 1.6 mm. F: Cánulas con sus respectivos fiadores adosadas mediante cemento plástico dental a un implante de electrodos.



pos intracorticales. En la realización de los implantes intraventriculares, se utilizan dos cánulas guía de 23 ga. de dm. externo y 28 ga. de dm. interno. Dichas cánulas se sitúan en paralelo y se sueldan con estaño a una distancia de 3.5 mm. En el interior de cada cánula se introduce un fiador de acero inoxidable de 28 ga. de dm. y 10,3 mm de longitud.

En la construcción de los implantes intracorticales, se utilizan dos cánulas guía de 23 ga. y 31 ga. de dm. externo e interno respectivamente. El diámetro interno, por tanto, es menor que el de las cánulas intraventriculares. Las cánulas, en este caso, se sueldan a una distancia de 1.6 mm. y poseen en su interior un fiador de 31 ga. de dm. y 10.3 mm de longitud. Previamente a la intervención quirúrgica, dichas cánulas se aplican al implante de electrodos mediante resina plástica Perfex de forma -- que se sitúen paralelas a éstos, 0.7 mm anteriores y 2.5 mm por encima de la punta de los electrodos. Esta preparación de cánulas y electrodos que permite la estimulación eléctrica y química cerebral separada o simultáneamente -- se denomina quemitrodo (ver fig. 12).

2.1.3.- IMPLANTES PARA PERFUSION "IN VIVO".

Los implantes empleados para perfusión intracerebral "in vivo" constan, al igual que los empleados para estimulación química, de electrodos para estimulación eléctrica y cánulas guía de acero inoxidable de 10 mm. de longitud. También en este tipo de implantes, las cánulas se acoplan a los electrodos mediante resina plástica de forma que quedan paralelas a éstos, 0.8 mm anteriores y 2.5 mm por encima de la punta del electrodo. Sin embargo, el diámetro interno de la cánula guía es mayor (20 ga.) --

para permitir la entrada del sistema de cánulas concéntricas (cánulas "push-pull") empleado para perfusión intracerebral. Cada cánula posee en su interior un fiador de 23 ga. de dm. y 10.2 mm de longitud.

2.2.- PROCEDIMIENTO QUIRURGICO: ESTEREOTAXIA.

Una vez construidos los electrodos y las cánulas, son implantados estereotáxicamente en el cerebro del animal mediante una intervención quirúrgica.

El material empleado en dicha intervención es - el siguiente:

- Bisturí (1).
- Destornillador de relojero (1).
- Espátula recta (1).
- Estereotáxico para roedores. David Kopf instruments 900.
- Fresas de corona esférica de 1.7 mm de diámetro.
- Lupa de relojero (1).
- Motor portafresas. Casali DSE-47.
- Pinzas hemostáticas (4).
- Pinzas rectas (1).
- Resina plástica Perfex. International Dental Products.
- Spongostam Film. Ferrosan Danmark.
- Tornillos de tapa Micro-57.

El instrumental quirúrgico se esterilizó antes de su uso en una cámara pupinel o en autoclave.

Previamente a la intervención quirúrgica, las ratas son anestesiadas con Equithesin. Dicho compuesto se prepara de la siguiente forma: Se disuelven 21.25 grs. de hidrato de cloral en 49,4 ml de etanol absoluto. Tras ob-

tener dicha disolución se añden de forma secuencial las siguientes soluciones:

- 1º 4.86 gr de pentobarbital sódico disueltos en 21 ml de agua bidestilada.
- 2º 198 ml de 1,2-propilenglicol.
- 3º 10,63 gr de sulfato magnésico disueltos en 50 ml de agua bidestilada.
- 4º agua bidestilada c.s.p. 500 ml.

La solución obtenida no debe introducirse en el frigorífico porque precipita.

Una vez preparado el Equithesin y esterilizado el material, se inicia la intervención quirúrgica. El procedimiento detallado es el siguiente:-

Tras pesar los animales, se administra Equithesin vía intraperitoneal a dosis de 2 ml/kg de peso. Cuando el animal está profundamente anestesiado, se coloca en el estereotáxico introduciendo sendos ejes en ambos conductos auditivos externos, y pinzando el maxilar superior en posición adecuada. Estas maniobras, consiguen fijar el cráneo en los tres planos del espacio. (ver fotografía 1).

Posteriormente, se realiza una incisión longitudinal de la piel y se separan ambas mitades cutáneas con cuatro pinzas hemostáticas. Una vez retirada la piel, se despega el periostio con el bisturí y se hemostasian con spongostán los puntos hemorrágicos quedando expuesta la calota.

Una vez abierto el campo quirúrgico, el siguiente paso consiste en la introducción de las cánulas y electrodos en las estructuras correspondientes teniendo en cuenta sus coordenadas estereotáxicas. Las coordenadas de la corteza prefrontal medial, según el atlas de Köning y Klippel (1967), son las siguientes: 3.7 mm anterior a bregma, 0.8 mm lateral a la línea media y 2.8 mm de profundidad por debajo de la duramadre. El punto bregma, por tanto,

se emplea como coordenada estereotáxica anteroposterior y se señala en la superficie de la calota con un lápiz (ver fotografía 2). Una vez señalado bregma, se sitúa el extremo del electrodo derecho sobre dicho punto. Seguidamente, se desplaza 0.8 mm en el plano lateral y 3.7 mm hacia adelante señalándose con un lápiz los puntos donde deben introducirse los electrodos. Posteriormente, se señalan sobre la calota tres puntos que no interfieran con el lugar donde se localizará el implante.

Con una fresa de corona esférica aplicada a un motor portafresas Casali DSE-47, se abren los cinco orificios marcados anteriormente quedando expuesta la duramadre. En los tres orificios de los tornillos, se emplazaron tornillos de fijación micro-57 (ver fotografía 3). Sobre los otros dos orificios trepanados, y tras tomar de nuevo las coordenadas estereotáxicas anteroposterior y lateral, se sitúa el implante de cánulas y electrodos. Seguidamente, se introduce el implante hasta que la punta de los electrodos toca la duramadre, punto de referencia para la coordenada de profundidad, y se introduce el electrodo 2.8 mm. El cable de acero inoxidable utilizado como tierra se enrosca a los tornillos de fijación.

Una vez situado el implante en el área deseada (corteza prefrontal medial), se fija a la calota con resina plástica Perfex. Dicha resina es líquida pero posteriormente se solidifica englobando en un bloque al implante, la tierra y los tornillos de fijación. Fraguada la resina, se retiran las cuatro pinzas hemostáticas y la piel cubre la parte inferior del implante. En las fotografías 4 y 5 se observa un implante de electrodos y cánulas transcurridas 2 semanas desde la intervención quirúrgica.

Cuando se implantan cánulas intraventriculares, el proceso es idéntico al descrito para el implante de electrodos y cánulas en la corteza prefrontal medial. -- Con la particularidad de que, antes de implantar los electrodos, se señalan con un lápiz las coordenadas estereotáxicas de los ventriculos laterales (1.5 mm posterior a bregma y 1.75 lateral a la línea media). Seguidamente, se abren los orificios con la fresa y se introducen las cánulas 2 mm por debajo de la duramadre fijándose a la calota con resina plástica. Una vez solidificada la resina, se implantan estereotáxicamente los electrodos y se fijan a la calota con resina quedando todo el implante como un sólo bloque.

Para proteger las cánulas y evitar que el animal se quite los fiadores, se coloca alrededor de ellas un anillo plástico que les sirve de protección (ver fotografías 4 y 5).

Finalizada la intervención, al animal se devuelve a su jaula vigilandose la ingesta de comida y bebida así como el peso durante los 4 días siguientes. A partir del 3°-4° día después de la operación, se movilizan diariamente los fiadores y se limpian con etanol al 70% con el fin de mantener permeables las cánulas durante toda la experimentación.

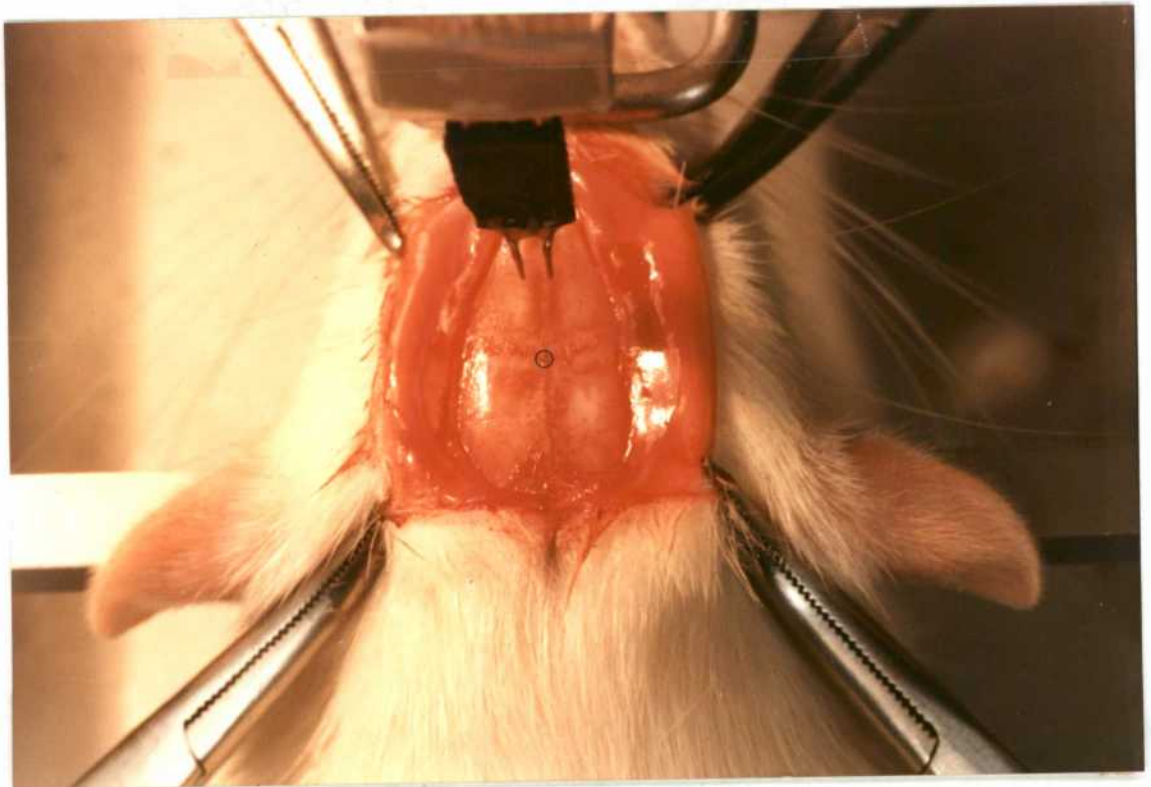
FOTOGRAFÍAS 1, 2, 3, 4 y 5

Las fotografías 1, 2 y 3 muestran tres momentos de la intervención quirúrgica. En la primera de ellas, se puede observar la fijación de la rata en el estereotáxico mediante dos barras auriculares y la sujeción del maxilar superior. La segunda fotografía muestra el punto bregma, usado como referencia en las coordenadas estereotáxicas, y la localización de los electrodos sobre la calota. La fotografía 3, muestra los orificios de penetración de los electrodos y la localización de los tornillos de fijación.

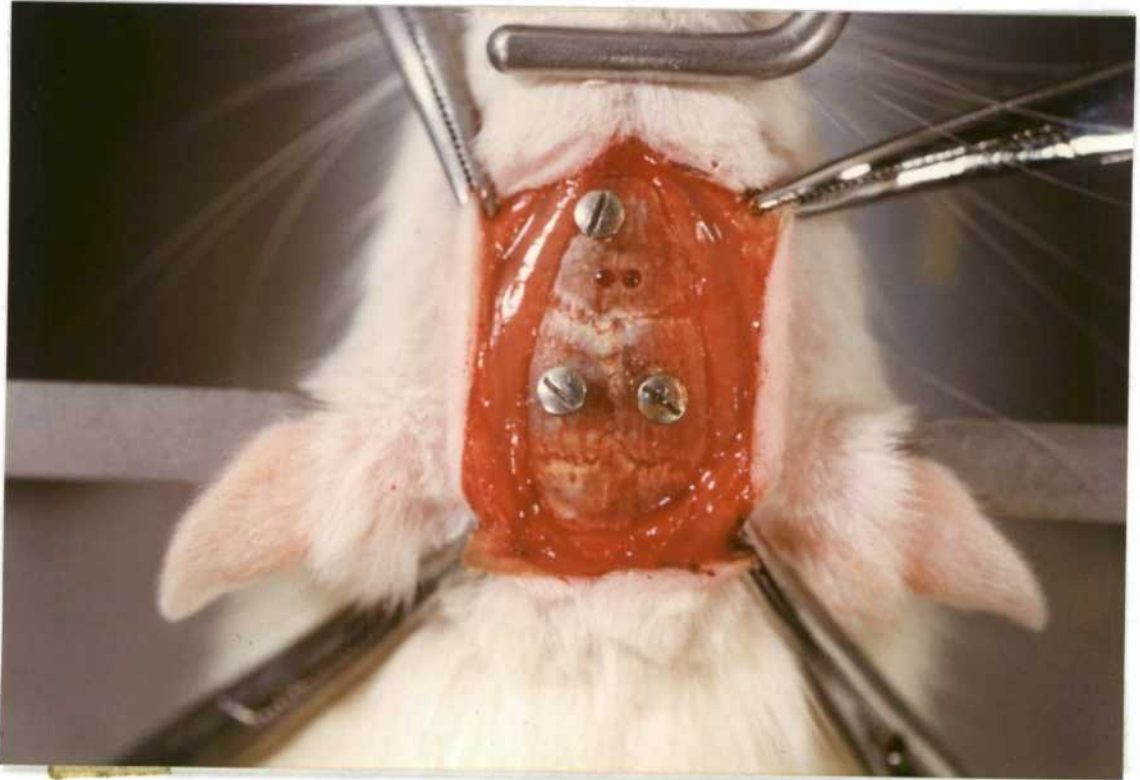
Las fotografías 4 y 5 muestran, en una visión craneal y lateral respectivamente, un implante de electrodos (E) y cánulas (C).



FOTOGRAFIA 1

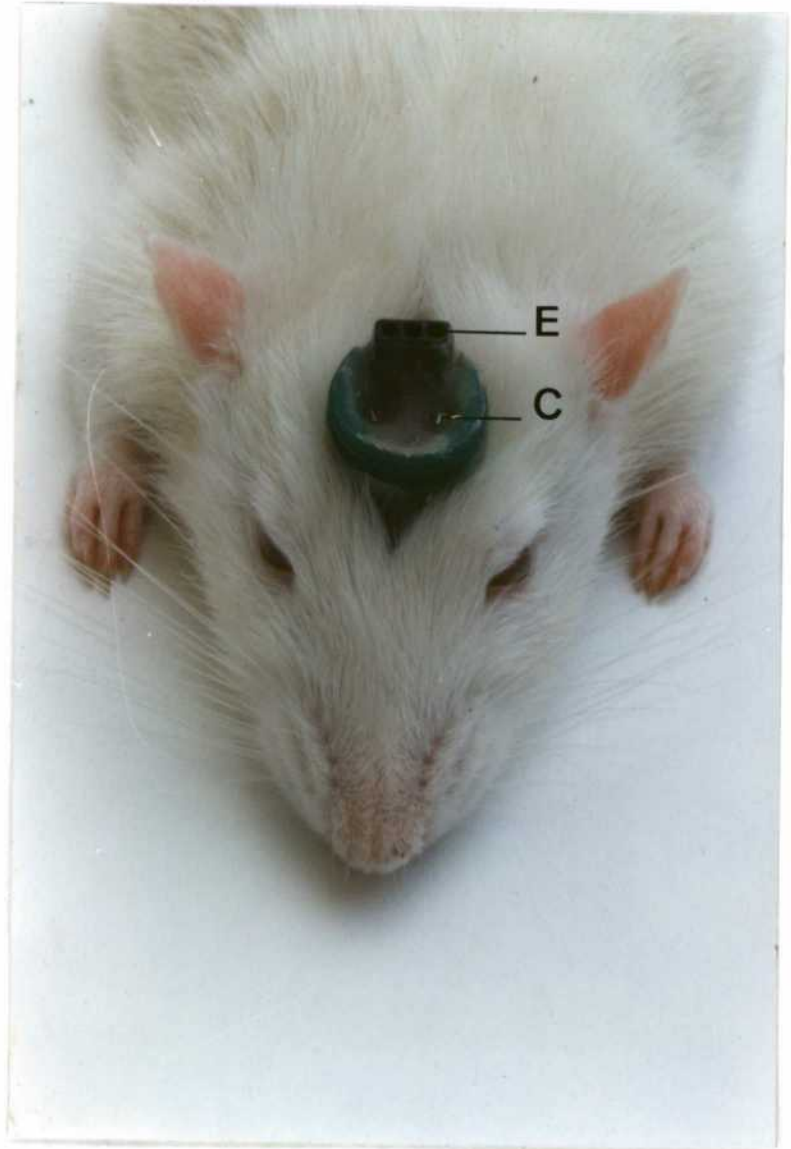


FOTOGRAFIA 2



FOTOGRAFIA 3

FOTOGRAFIA 4



FOTOGRAFIA 5



3.- METODOS EXPERIMENTALES.

3.1.- ESTIMULACION ELECTRICA CEREBRAL.

Una semana después de la intervención quirúrgica y tras su completa recuperación, el animal aprende a obtener estimulación eléctrica de su cerebro (autoestimulación) La estimulación eléctrica consiste en un tren de ondas cuadradas monofásicas negativas de 0.3 segundos de duración, - 0.5 msec. de duración del pulso y una frecuencia de 100 - Hz. La intensidad del estímulo varía de un animal a otro, aunque es constante para cada rata, y se obtiene tras la - realización de una curva de intensidad-respuesta.

El material empleado para la estimulación eléc-- trica cerebral es el siguiente:

- Cajas de experimentación. Letica 26x29x36 cm. LI 830 (2).
- Contador eléctrico (4)..
- Estimulador Cibertec. Mod. CS-220 A.
- Módulo digital. Letica LI 2.300 (2).
- Osciloscopio. Telequipment D 61A.

Esquemáticamente, el circuito funciona de la si-- guiente manera (ver fig. 13): La caja de experimentación posee en su interior una palanca y un cable bipolar que -- conduce el estímulo eléctrico al implante de la rata. El - polo positivo de dicho cable se introduce en el conector - central que está unido a tierra a través de los tornillos de fijación. El polo negativo se introduce en el conector derecho si queremos estimular la corteza prefrontal dere-- cha o en el conector izquierdo para estimular la corteza - izquierda. Al apretar la palanca de la jaula de experimen-- tación, se cierra el circuito y el temporizador adosado --

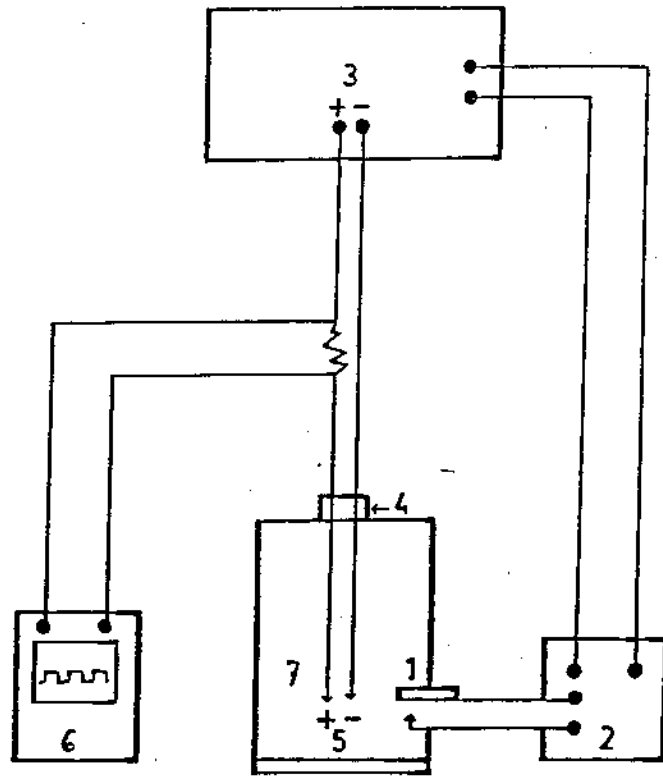


FIGURA 13

Representación esquemática del circuito de -
estimulación eléctrica. 1: Palanca de autoestimulación.
2: Módulo digital y temporizador. 3: Estimulador. 4: -
Distribuidor de mercurio. 5: Conexiones (tierra y elec
trodo de estimulación). 6: Osciloscopio. 7: Caja de ex
perimentación.

al módulo digital envía al estimulador una señal de 0.3 -- seg. de duración. Como consecuencia, el estimulador origina una corriente pulsante de las características antes mencionadas y de intensidad regulable. Dicha corriente es conducida por el cable bipolar hasta el implante. Las características del estímulo eléctrico se observan en el osciloscopio. La tasa de autoestimulación es registrada numéricamente por un contador aplicado al sistema.

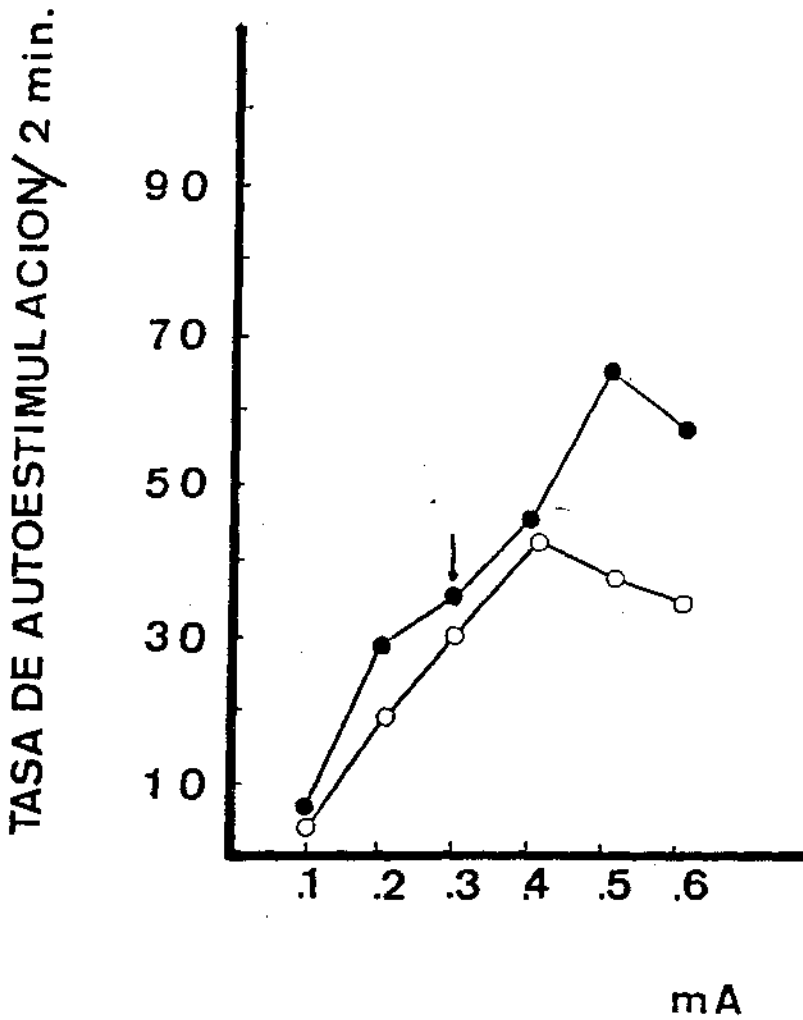
3.1.1.- OBTENCION DE AUTOESTIMULACION CEREBRAL.

Tras conectar el cable bipolar al implante de la forma indicada anteriormente, la rata se introduce en la caja de experimentación durante 30 minutos. Cada vez que el animal se aproxima a la palanca, el experimentador cierra el circuito y la rata recibe el estímulo eléctrico. Estas sesiones de 30 min. de duración, se repiten diariamente hasta que el animal aprieta espontáneamente la palanca para obtener estimulación eléctrica de su cerebro.

Una vez que el animal se autoestimula de una forma constante y reproducible, se realiza una curva de intensidad-respuesta con el fin de obtener la intensidad idónea para cada animal. Dicha curva se obtiene determinando la variación de la tasa (frecuencia) de autoestimulación, en función de la intensidad del estímulo. El rango de intensidades empleado está comprendido entre 100 y 600 uA. Para cada intensidad se mide la tasa de autoestimulación durante dos minutos. La curva de intensidad-respuesta se realiza en 1^{er} lugar variando las intensidades en sentido creciente (de 100 a 600 uA). Transcurridos 20 minutos, se repite la curva en sentido decreciente (intensidades de 600 uA a 100 uA).

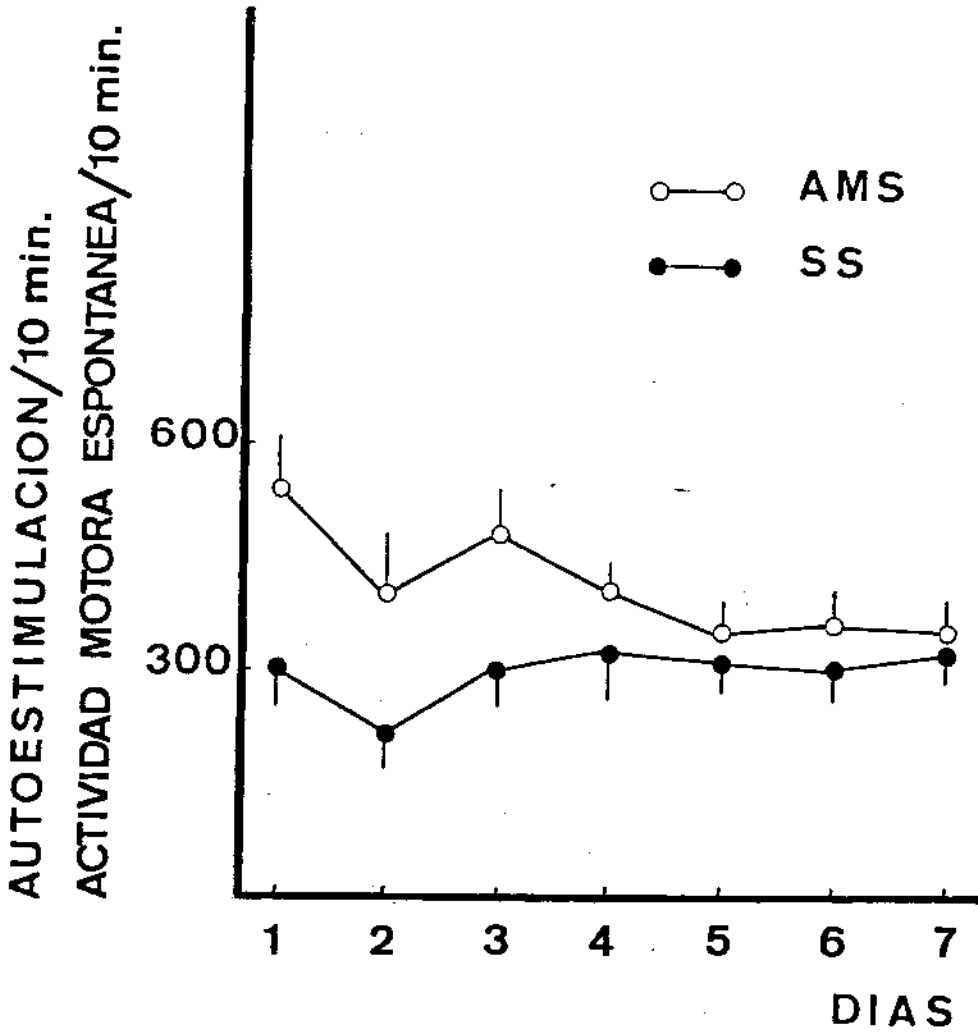
Una vez realizadas las dos curvas, se determina - la intensidad umbral, la intensidad con mayor tasa de autoestimulación y la intensidad en la que el animal presenta - componente motor. La intensidad elegida para los experimentos debe cumplir los siguientes requisitos: ser más alta -- que la intensidad umbral, no originar la mayor tasa de respuesta y permitir una reproducibilidad de la autoestimulación sin producir efectos motores (ver ejemplo en gráfica 1). La intensidad idónea para la mayoría de los animales está comprendida entre 200 y 350 uA.

Elegida la intensidad idónea, el animal se introduce diariamente en la caja de experimentación y se controla su tasa de autoestimulación. Durante los primeros días, dicha tasa muestra una gran fluctuación estadística. En los días sucesivos, la fluctuación decrece hasta dejar de ser - estadísticamente significativa (ver gráfica 2). En este momento la tasa de autoestimulación se considera estabilizada y se inician los experimentos.



GRAFICA 1

Ejemplo de curva de intensidad-respuesta realizada en sentido creciente (círculos abiertos) y decreciente (círculos cerrados). El rango de intensidades empleado fué de 0.1-0.6 mA. La intensidad elegida en este caso fué de 0.3 mA (flecha).



GRAFICA 2

Estabilización de la tasa de autoestimulación (SS) y actividad motora espontánea (AMS) durante la primera semana.

3.2.- REGISTRO DE LA ACTIVIDAD MOTORA ESPONTANEA.

El material empleado en el estudio de la motilidad espontánea es el siguiente:

- Actímetro. Letica LI 300 (2).
- Caja de experimentación. Letica 26 x 29 x 36 cm. LI 830 (2).
- Contador eléctrico. Letica (2).

El registro de la actividad motora se realiza de la siguiente forma: El suelo de la caja de experimentación posee una serie de barras metálicas conectadas individualmente a un actímetro de cuatro canales. Entre cada dos barras conectadas a diferentes canales, existe una barra metálica conectada a tierra. De esta forma, al desplazarse la rata cierra el circuito entre tierra y uno o varios canales (1,2,3 ó 4). Cada cierre da lugar a un pulso que se registra por un contador adaptado al actímetro.

En los primeros registros, la actividad motora espontánea muestra una elevada tasa y una gran fluctuación estadística. Posteriormente, la motilidad disminuye y la fluctuación en los resultados decrece hasta ser estadísticamente no significativa. Es en este momento, cuando se considera que la motilidad está estabilizada y se inician los experimentos (gráfica 2).

Una vez estabilizada la tasa de motilidad, las ratas se introducen diariamente y a la misma hora en la caja de experimentación durante 15 minutos, controlandose la tasa de motilidad cada 5 min.

3.3.- ESTIMULACION QUIMICA CEREBRAL.

La estimulación química del cerebro se realiza mediante la microinyección de fármacos. Estos fármacos - han sido administrados a dos niveles: intraventricular o intracortical. El método experimental seguido para cada vía de administración es diferente. Por ello, se detallan por separado.

3.3.1.- ADMINISTRACION INTRAVENTRICULAR.

Para la microinyección de fármacos en ventrículos laterales se utiliza el siguiente material:

- Cánulas de acero inoxidable de 28 ga de dm. externo.
- Tubo flexible de polietileno PE-20. Intramedic Clay Adams.

El sistema de microinyección consta de una cánula inyectora de 28 ga de dm. externo y 12 mm de longitud. Dicha cánula se conecta a uno de los extremos de un tubo flexible de polietileno de 60 cm de longitud que está señalizado en cada ul de volumen.

La microinyección intraventricular se ha realizado mediante dos procedimientos:

1.- Microinyección por presión hidrostática. - Tras retirar el fiador, se introduce la cánula inyectora en el interior de la cánula guía. Previamente, el extremo distal del polietileno ha sido pinzado y se mantiene 50 cm. sobre el nivel de la inyectora con ayuda de un colaborador. Una vez introducida la inyectora, se quita la pinza del polietileno y el líquido desciende por pre---

sión hidrostática. El volumen de solución inyectado en cada ventrículo es de 5 ul. Antes de retirar la inyectora, se espera un tiempo de un minuto para permitir la correcta difusión de la droga. Por último, se coloca el fiador y se introduce el animal en la caja de experimentación testificándose inmediatamente la autoestimulación o la actividad motora espontánea.

2.- Microinyección mediante bomba de infusión. - El procedimiento de microinyección es similar al anterior pero la inyección de líquido se realiza conectando el extremo distal del tubo de polietileno a una bomba de infusión Harward 940A. El volumen de solución inyectado es idéntico al anterior (5 ul de disolución en cada ventrículo). La velocidad de infusión es similar a la velocidad de entrada de líquido por presión hidrostática.

Independientemente del método empleado, se comprobó la correcta canulación de los ventrículos laterales en dos momentos del desarrollo experimental: El 1^{er} control se realizó antes de iniciar la inyección de los fármacos - mediante la administración intraventricular de angiotensina II. Dicho fármaco inyectado intraventricularmente a dosis de 0.05-4 ug. induce una ingesta mantenida de agua en un animal previamente saciado (Epstein et al., 1970). Sólo los animales que respondieron positivamente con ingesta mantenida de agua se emplearon en los experimentos.

El segundo control se realiza al terminar la experimentación mediante la administración intracanal de 1 ul de tinta china y la posterior verificación histológica de la impregnación de los ventrículos laterales.

3.3.2.- ADMINISTRACION INTRACEREBRAL.

Para la administración de fármacos en la corteza prefrontal medial se emplea el siguiente material:

- Bomba de infusión. Harward apparatus 940-A.
- Cánulas de acero inoxidable de 31 ga de dm. ex terno.
- Jeringa Hamilton de 10 ul.
- Tubo flexible de polietileno PE-10. Intamedic Clay Adams.

El sistema de microinyección intracortical consta de una cánula inyectora de 31 ga de dm. externo y 12 mm de longitud. Dicha cánula se conecta por medio de un tubo flexible de polietileno a una jeringa de 10 ul. La jeringa se coloca en una bomba de infusión Harward (ver figura 14).

El procedimiento de microinyección intracortical es el siguiente: Tras retirar el fiador de la cánula guía, se introduce la cánula inyectora en toda su longitud. Posteriormente, se inyecta 1 ul. de disolución del fármaco en un tiempo de 1 minuto. Terminada la inyección, la cánula - inyectora se mantiene en su posición durante un tiempo de 1 min. para permitir una adecuada difusión de la droga (Myers, 1974). Por último, se retira la inyectora y, tras colocar el fiador se introduce el animal en la caja de experimentación testificandose la autoestimulación o la actividad motora espontánea.

Tanto en las microinyecciones intraventriculares como en las intracorticales, los fármacos fueron disueltos en NaOH 1 M y NaH_2PO_4 1 M (2/3) (v/v) (modificado de Simon et al., 1984). Una vez disueltos, se realizaron alícuotas de 25 ul que se congelaron a -40° . Previamente a la administración, las alícuotas fueron descongeladas y disueltas en LCRs en mayor o menor cantidad (v) dependiendo de la dosis a inyectar. El pH de la solución osciló entre 6-7.

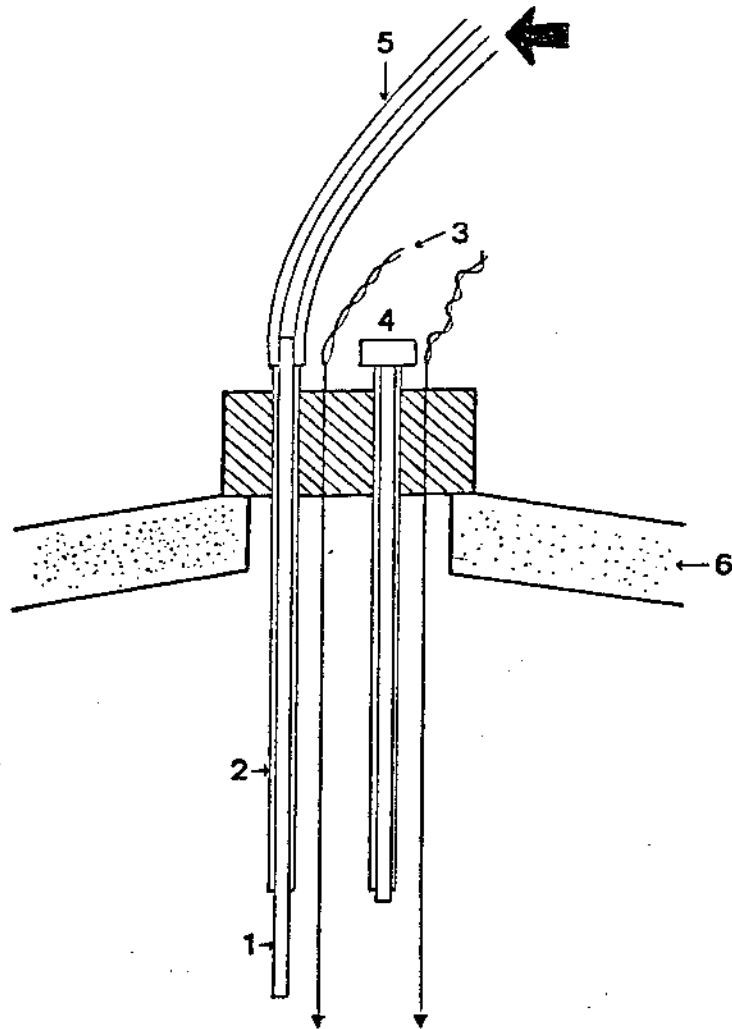


FIGURA 14

Representación esquemática del sistema de microinyección intracortical (1 y 5) y de los quemitrodos (2,3 y 4) implantados en la calota de la rata (6).

1: Cánula inyectora. 2: Cánula guía. 3: Electrodo de estimulación. 4: Fiador de la cánula guía. 5: Tubo de polietileno unido a la cánula inyectora por su extremo proximal. 6: Calota.

3.4.- PERFUSION INTRACEREBRAL "IN VIVO".

La perfusión intracerebral "in vivo" se realiza mediante un sistema de cánulas concéntricas o cánulas "push-pull". Dicho sistema permite la infusión de líquido cefalorraquídeo sintético en una estructura determinada a través de la cánula "push" y su posterior recogida, junto con las sustancias químicas (NT) liberadas, a través de otra cánula: la cánula "pull".

En la construcción de las cánulas "push-pull" se emplea el siguiente material:

- Cánulas de acero inoxidable de 18 ga, 23 ga y 30 ga de dm. externo.
- Tubo flexible de polietileno PE-10, PE-50 y PE 60. Intramedic Clay Adams.

El sistema de cánulas concéntricas se construye de la siguiente forma (ver fig. 15):

Se introduce una cánula de 30 ga o cánula "push" en el interior de una cánula de 23 ga o cánula "pull". Entre los extremos proximales de ambas cánulas debe existir una distancia de 0.3 mm (fig.15a). Este sistema concéntrico se introduce, a su vez, en el interior de una cánula de 18 ga de diámetro. Dicha cánula posee un gran diámetro pero poca longitud. Como consecuencia, por uno de sus extremos sobresale el sistema de cánulas concéntricas y por el otro sobresale la cánula "push" (fig.15b). En este último extremo, se introduce otra cánula "pull" biselada de 23 ga (fig. 15c). Ambos extremos se sueldan con estaño. De esta forma, la cánula de 18 ga se convierte en una cámara perfectamente cerrada en la que el líquido penetra a través de la cánula "pull" concéntrica y es recogido por la cánula "pull" biselada (fig. 15c). El extremo distal de la cá-

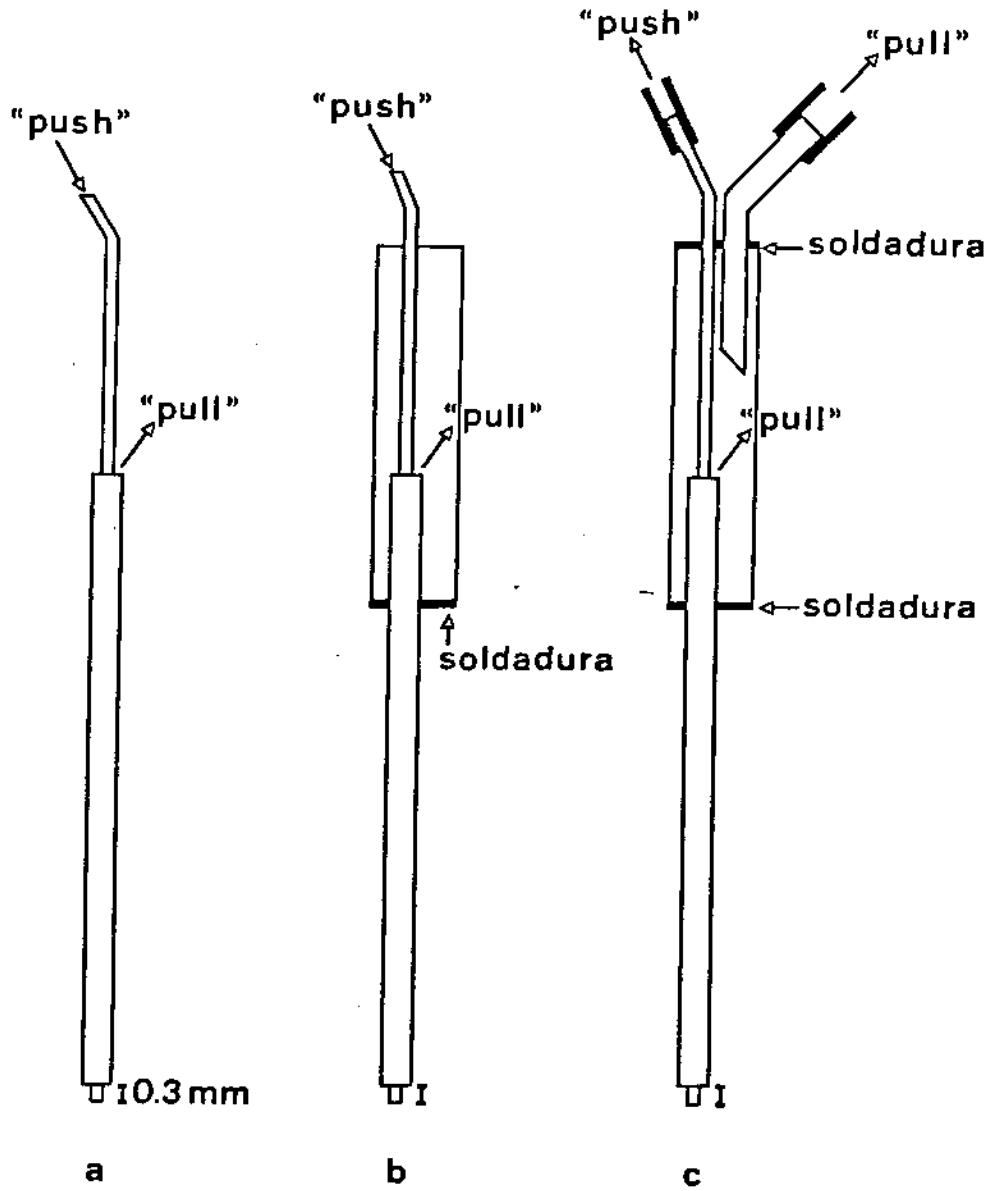
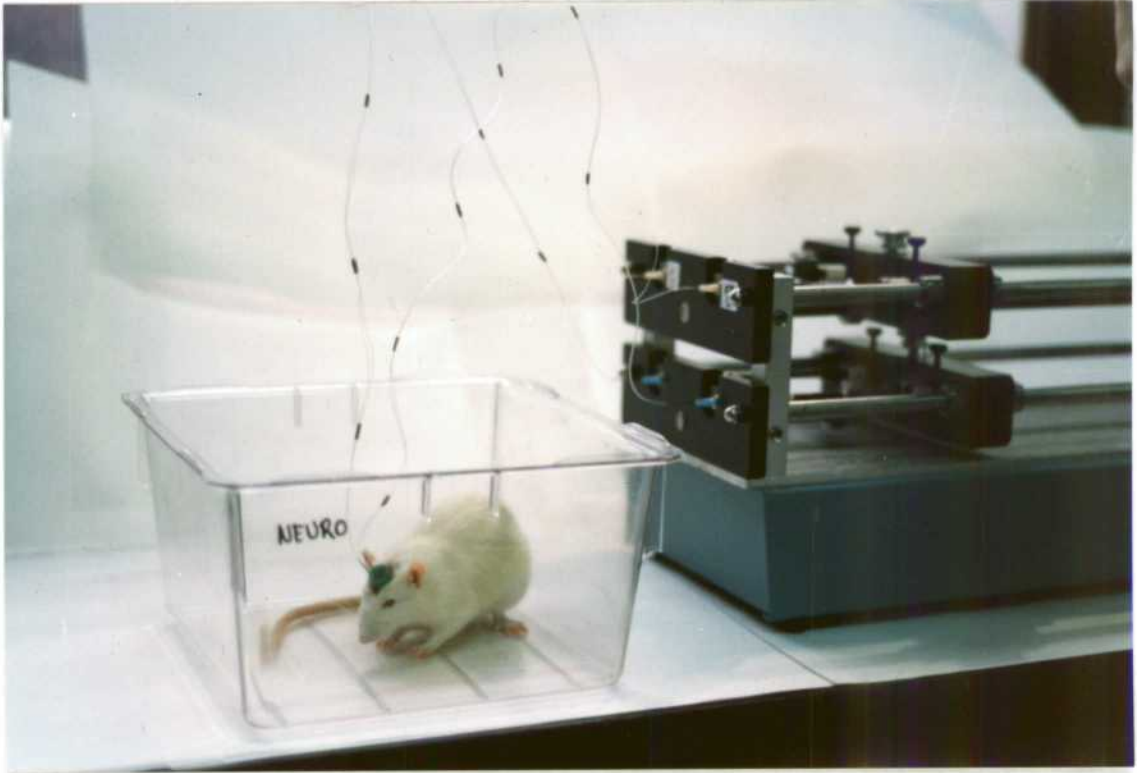


FIGURA 15

Representación esquemática de la construcción de las cánulas "push-pull". a: Cánula "push" en el interior de la cánula "pull" concéntrica. b: Sistema concéntrico de cánulas "push-pull" introducido en la cámara - de 18 ga. c: Introducción de la cánula "pull" biselada.

FOTOGRAFIAS 6 y 7

La fotografía 6 muestra dos sistemas de cánulas "push-pull" introducidos en las cánulas guía y conectados a la bomba de infusión-succión. Un detalle de los dos sistemas de perfusión "push-pull" puede observarse en la fotografía 7.



FOTOGRAFIA 6



FOTOGRAFIA 7

nula "pull" se une a un tubo flexible de polietileno PE-50 y el de la cánula "push" a otro tubo de polietileno PE-10. Estos tubos permiten conectar la cánula "push-pull" a dos jeringas Hamilton acopladas a una bomba de infusión-succión Harward 940-A (ver fotografías 6 y 7).

El procedimiento de perfusión es el siguiente:

Tras retirar el fiador de la cánula guía, se introduce el sistema de cánulas concéntricas en toda su longitud. Este sistema es móvil permitiendo perfundir diferentes puntos de una estructura cerebral estereotáxicamente determinada. En la presente Tesis Doctoral, se perfundió un solo punto de la corteza prefrontal medial. Por ello, se coloca un tope de polietileno PE-60 que permite que la cánula inyectora tenga una longitud fija de 11.5 mm. La perfusión se realiza 1 mm por encima de la punta del electrodo de estimulación.

Introducida la cánula "push-pull" en la localización adecuada, se perfunde a través de la cánula "push" líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs) a una velocidad de 18 ul/min. La composición del LCRs es la siguiente: $Cl^- = 134.7$ mM; $Na^+ = 127.7$ mM; $K^+ = 2.6$ mM ; $Ca^{++} = 1.3$ mM; $Mg^{++} = 0.9$ mM. Este líquido, tras bañar un área cerebral de aproximadamente 1.5 mm de diámetro (Myers, 1986), es recogido por la cánula "pull" a una velocidad idéntica a la de infusión. El perfundido obtenido, por tanto, poseerá el LCRs - infundido junto con las sustancias químicas liberadas en dicha zona cerebral. Previamente a la perfusión, el LCRs es filtrado a través de un filtro millipore de 0.22 micras y almacenado en un frasco apirógeno.

El protocolo experimental consiste en 4 perfusiones de 5 minutos de duración cada una, con un intervalo de cinco minutos entre ellas (5 min. ON/5 min. OFF). Las -

dos primeras perfusiones se descartan. La tercera perfusión es control o pre-estímulo. Durante la cuarta perfusión se realiza la estimulación eléctrica.

Esta secuencia de cuatro perfusiones se repite durante tres días consecutivos. El primer día el estímulo eléctrico tiene una intensidad umbral (150 uA); el segundo día el estímulo eléctrico posee una intensidad idéntica a la de estimulación (300 uA) y el tercer día 600 uA de intensidad. Este mismo protocolo experimental (5 mi. ON/ 5 min. OFF) se realizó en un segundo grupo de animales pero, en este caso, las tres perfusiones realizadas fueron basales o control.

Una vez obtenidos los perfundidos, se filtran a través de un filtro millipore de 0.22 micras mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 30 minutos. Filtrados los perfundidos, se mantienen en el arcón frigorífico a -80 °C hasta el momento de su análisis.

3.5.- ANALISIS DE AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

3.5.1.- CUANTIFICACION DE LOS AMINOACIDOS COMO OPA-DERIVADOS.

Para la detección y cuantificación de los aminoácidos presentes en las muestras de perfundido, se realiza una derivación pre-columna con el reactivo o-ftaldialdehído-tert-butíltiol (OPA-tertbutiltiol) de acuerdo con el método descrito por Allison et al. (1984) y modificado por Peinado et al. (1986):

El material necesario para la preparación del reactivo OPA-tertbutiltiol es el siguiente:

- Borato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$). Merck.
- Metanol grado HPLC. Sharlau.
- o-ftaldialdehído. Sigma.
- 2 -metil-propanotiol. Sigma.

El reactivo se prepara de la siguiente forma: Tras disolver 135 mg. de o-ftaldialdehído en 2.5 ml. de metanol, se añaden 50 ul de 2, metil-propanotiol. Posteriormente, se añade lentamente una solución de buffer borato 0.1 M ajustada a un pH de 9.5. La cantidad de buffer añadida debe enrasar la probeta en 25 ml. La solución se conserva a temperatura ambiente en un frasco coloreado y cerrado adecuadamente.

La derivación precolumna de los aminoácidos se realiza de la siguiente manera:

Tras añadir 4 ul de estándar interno (homoserina 0.05 mM) a una alícuota de muestra de 20 ul, se mezcla

con 10 ul de reactivo OPA-tertbutiltiol. Para favorecer la reacción, la mezcla se agita en un vortex durante 15 seg. Transcurridos dos minutos, se le añaden 5 ul de ácido acético al 5% con objeto de disminuir el pH de la mezcla y evitar la pérdida de sílice por la columna (Martín del Rio et al., comunicación personal). Añadido el ácido acético, se inyectan en el cromatógrafo 20 ul de la mezcla.

3.5.2.- CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Todos los perfundidos se analizaron en un cromatógrafo Waters 600 E acoplado a un detector de fluorescencia Waters 420-AC.

El cromatógrafo lleva incorporada una columna de fase reversa Resolve C₁₈ (Waters) de 15 cm. de longitud, 5 micras de tamaño de partícula y 100 Å de diámetro de poro. También lleva incorporada una pre-columna Resolve C₁₈ (Waters).

En la preparación de la fase móvil se emplean los siguientes reactivos:

- Tampón acetato sódico 4 M. Serva.
- Alcohol isopropílico grado HPLC. Sharlau.
- Metanol grado HPLC. Sharlau.
- Agua ultrapura obtenida de un sistema Milli-Q y filtrada a través de un filtro de 0.45 u.

La fase móvil empleada consta de dos soluciones (Herranz et al., 1985):

1.- Solución A: Consiste en una mezcla 95:5 (v/v) de tampón acetato sódico 50 mM y metanol, a la que se

añaden 12.5 ml de alcohol isopropílico por cada litro de mezcla. El tampón se prepara a partir de una solución de acetato sódico 4 M ajustandose su pH a 5.88. Posteriormente, es filtrado mediante un sistema de vacío a través de un filtro de 0.45 micras.

2.- Solución B: Es una mezcla 70:30 (v/v) de metanol y agua.

Previamente a su empleo, ambas soluciones se introducen en un baño de sonicación durante 15 min. Posteriormente, se colocan en el cromatógrafo y se les introduce un burbujeo de helio a un flujo de 100 ml/min. durante 5 min. Durante el análisis el flujo de helio es de 10 ml/min.

Para conseguir una correcta separación de los picos correspondientes a cada aminoácido, la fase móvil posee un flujo constante de 1.2 ml/min. y penetra en el cromatógrafo mediante el siguiente programa de gradientes:

TIEMPO	FLUJO	%A	%B	
0 min.	1.2 ml/min	50	50	} ANALISIS
5 min.	1.2 "	30	70	
16 min.	1.2 "	15	85	
16.01	1.2	0	100	} LIMPIEZA
24.00	1.2	0	100	
24.01	1.2	50	50	} PREPARACION
29.00	1.2	50	50	

Este programa de gradientes es diferente al empleado por Herranz et al. (1985), ya que estos autores utilizan un reactivo de derivación diferente (OPA-mercaptopropiónico). Dicho programa se obtuvo modificando las proporciones de fase móvil A y B hasta obtener una adecuada separación de los picos cromatográficos. Dos ejemplos de cromatogramas obtenidos de una solución patrón (A) y

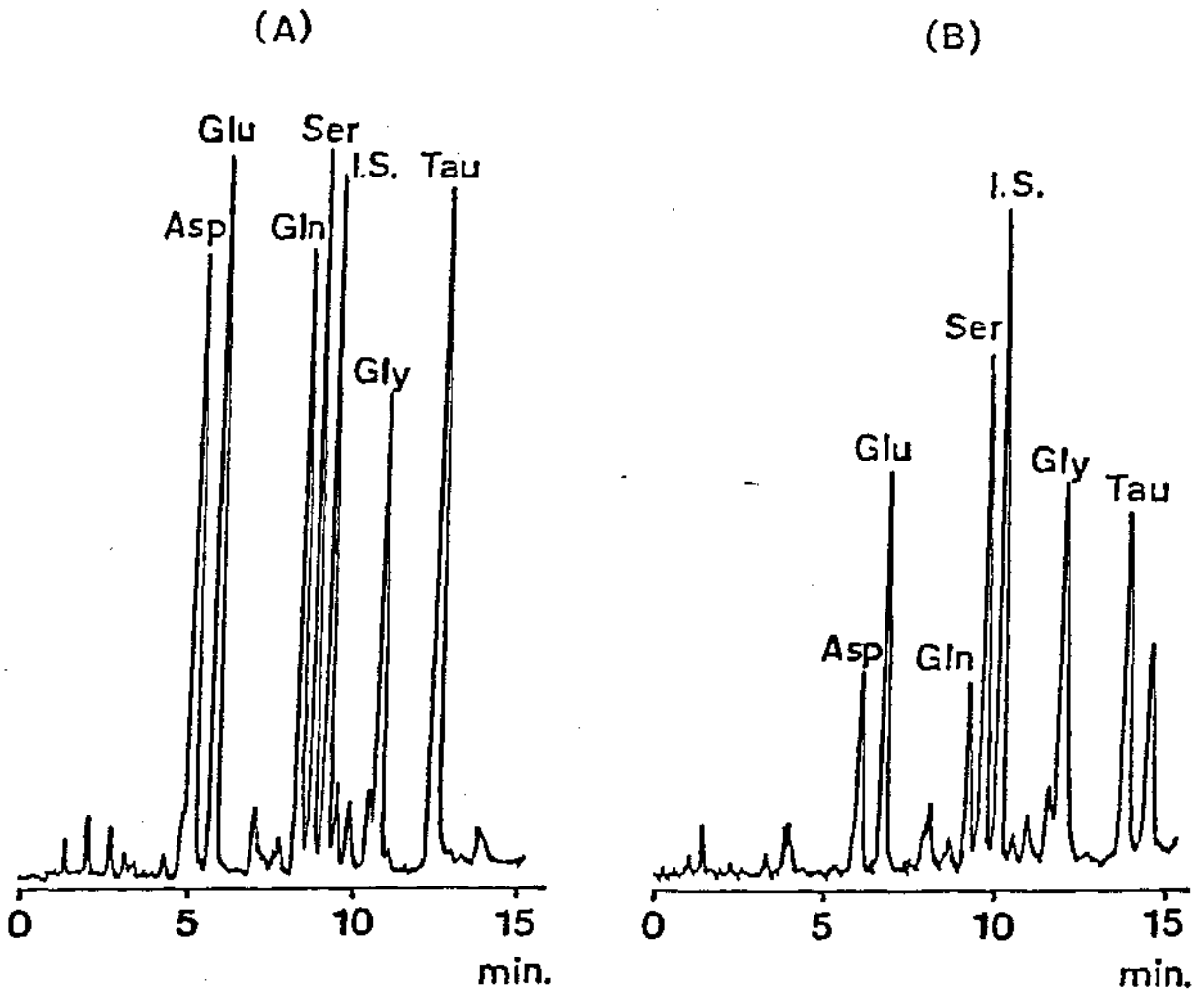


FIGURA 16

Cromatogramas obtenidos de: (A) Una solución estándar que contiene Asp, Glu, Gln, Ser, Gly, Tau y - estándar interno (homoserina)(I.S.). (B) Una muestra - de perfundido obtenido de la corteza prefrontal medial de la rata.

de uno de los perfundidos obtenidos en la corteza prefrontal medial (B) pueden observarse en la figura 16.

La detección de los OPA-derivados se realiza con un detector de fluorescencia con un filtro de excitación de 340 nm y otro de emisión de 460 nm.

El cálculo de los factores de respuesta, tiempos de retención y la cuantificación de los aminoácidos, se realiza con un integrador registrador Waters 745 siguiendo el método del estándar interno. El estándar interno empleado fué la homoserina (Peinado et al., 1986).

CALIBRACION

Para obtener la tabla de calibración, se preparan soluciones estándar de cada uno de los aminoácidos (aspártico, glutámico, glutamina, serina, homoserina, glicina y taurina) a una concentración 0.05 mM salvo en el caso de la taurina cuya concentración es de 0.15 mM.

Los aminoácidos empleados son los siguientes:

- L-Aspártico. Sigma.
- L-Glutámico. Sigma.
- L-Glutamina. Sigma.
- L-Serina. Sigma.
- DL-Homoserina. Sigma.
- Glicina. Sigma.
- Taurina. Sigma.

El disolvente empleado en todas las disoluciones líquido cefalorraquídeo sintético (ver composición en el apartado 3.4.). Para una correcta disolución, se introducen las soluciones estándar en un baño de sonicación durante 20 minutos.

La solución PATRON se obtiene mezclando 200 ul

de la solución estándar de cada aminoácido, excepto del estándar interno, y separando alicuotas de 20 ul.

El tiempo de retención de cada aminoácido se obtiene inyectando 4 ul de la solución estándar de dicho aminoácido diluidas en 20 ul de LCRs y convenientemente derivados (tal y como se describe en el apartado 3.5.1.).

Los factores de respuesta para cada aminoácido se obtienen tras inyectar 10 alicuotas de solución PATRON que contiene aspártico, glutámico, glutamina, serina, glicina y taurina. Previamente a la inyección, se añaden a la solución patrón 4 ul de estándar interno (homoserina) y la mezcla se deriva con 10 ul de OPA. Posteriormente, se añaden 5 ul de ácido acético al 5% y se inyectan en el cromatógrafo 20 ul de la mezcla final.

Una vez inyectadas las 10 muestras de calibración, se obtienen los factores de respuesta (FR) para cada aminoácido y los tiempos de retención medios (TR). Un ejemplo de tabla de calibración es la siguiente:

<u>AMINOACIDO</u>	<u>FR</u>	<u>TR</u>
Aspártico	0.704	5.93
Glutámico	0.788	6.71
Glutamina	1.054	9.41
Serina	0.725	9.88
Homoserina (I.S.)	0	10.36
Glicina	0.936	12.25
Taurina	2.59	14.20

FACTOR DE DILUCION

A los 20 ul que posee la alicuota de perfundido o de solución patrón se añaden, como hemos mencionado anteriormente, 4 ul de standard interno, 10 ul de OPA y 5 ul de ácido acético al 5%. Por tanto, el volumen final de la mezcla es de 39 ul. De estos 39 ul, se introducen en el cromatógrafo 20 ul. Haciendo el cálculo correspondiente, se obtiene que de los 20 ul inyectados sólo ---- 10.256 ul corresponden a muestra. Como consecuencia, para obtener la concentración de aminoácido presente en la -- muestra (pmoles/ul) deben dividirse los picomoles obtenidos entre 10.256 ul de muestra ó, lo que es igual, multiplicarse por 0.0975. El factor de dilución o de multiplicación empleado, por tanto, es 0.0975.

CALCULO DEL COEFICIENTE DE VARIACION.

Una vez calibrado el sistema, se realizan 5-10 inyecciones de la misma solución patrón y se obtienen -- las concentraciones (pmoles/ul) de cada aminoácido. Posteriormente, se hallan las medias y los coeficientes de variación de los valores obtenidos para cada aminoácido. Los coeficientes de variación se calculan mediante la siguiente fórmula (Martín de Andrés et al., 1981):

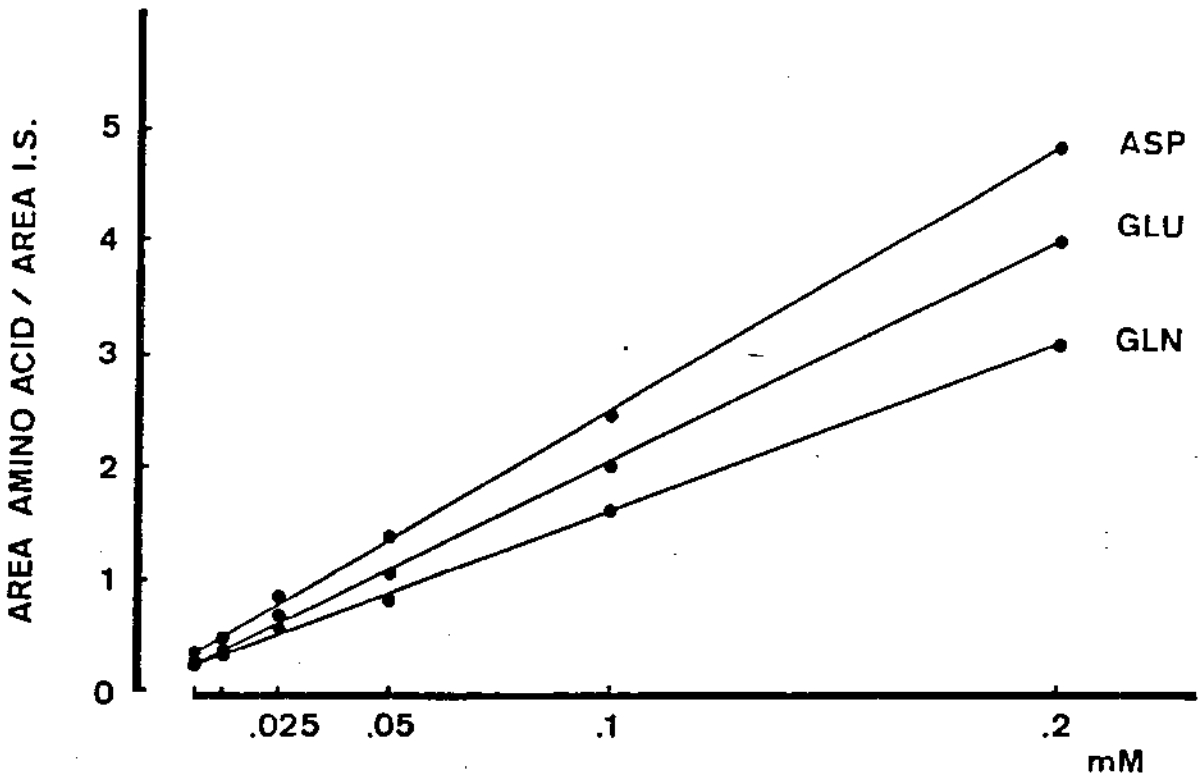
$$C.V. = \frac{S \text{ (desviación típica)}}{\bar{x} \text{ (media)}} \times 100$$

Dado que se inyectan alicuotas de la misma solución, realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias en los re-- sultados nos indican la variación intrínseca al método - de análisis. El coeficiente de variación obtenido para - cada aminoácido puede observarse en la siguiente tabla:

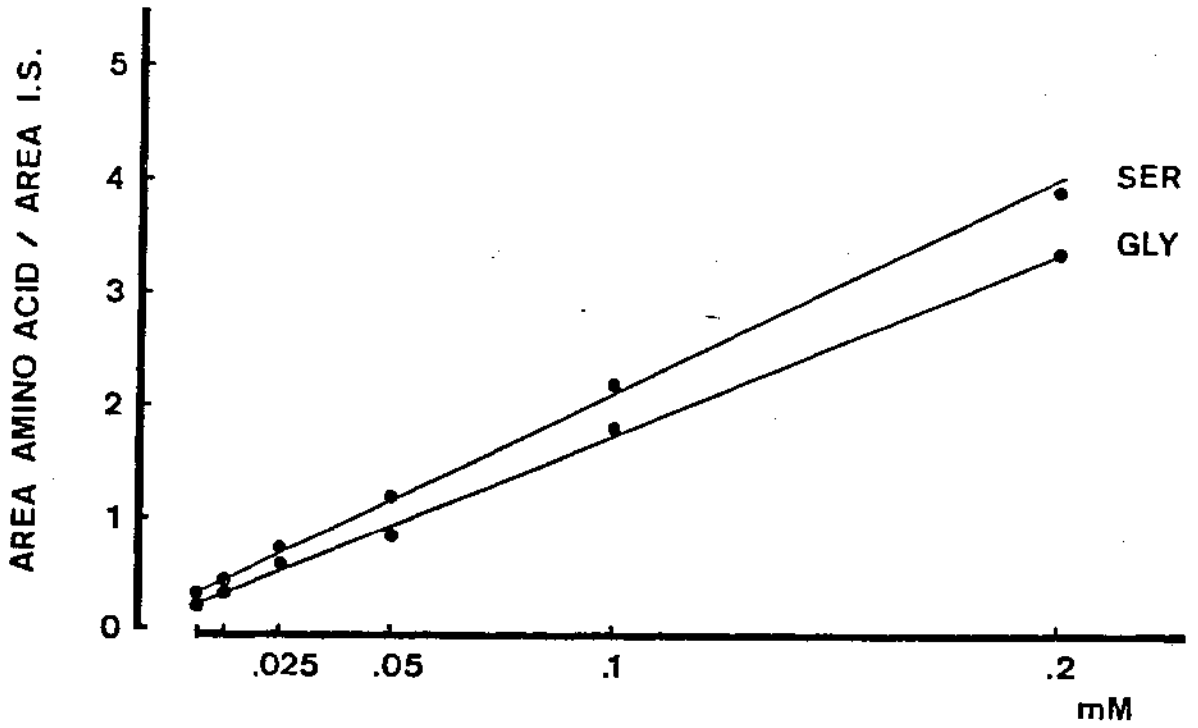
	\bar{x}	n	σ_{n-1}	C.V.
Aspártico	8.078	5	0.183	2.26%
Glutámico	8.005	5	0.182	2.27%
Glutamina	8.180	5	0.100	1.23%
Serina	8.396	5	0.300	3.57%
Glicina	8.480	5	0.370	4.36%
Taurina	23.426	5	0.872	3.72%

CURVA DE LINEALIDAD

La linealidad de los ensayos se determina sobre las bases del área obtenida para cada aminoácido en relación al área del estándar interno (homoserina). Para ello, se inyectan soluciones patrón con una concentración constante de homoserina (4 ul de homoserina 0.05 mM= 102.56 pmoles) y concentraciones variables de los aminoácidos a estudiar. Estas concentraciones se obtienen diluyendo una solución patrón 0.2 mM para cada aminoácido en LCRs. Las concentraciones empleadas fueron las siguientes: 0.2 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.025 mM, 0.0125 mM, 0.00625 mM. Las curvas obtenidas para cada uno de los aminoácidos estudiados (Asp, Glu, Gln, Ser, Gly y Tau) pueden observarse en las gráficas 3 y 4.



GRAFICA 3. - Curva de linealidad obtenida para los aminoácidos ácidos (aspártico, glutámico y glutamina), en relación al área del estándar interno.



GRAFICA 4 .- Curva de linealidad obtenida para los aminoácidos Serina y Glicina, en relación al área del estándar interno.

3.6.- HISTOLOGIA.

Finalizados los experimentos, se comprueba la correcta localización de cánulas y electrodos mediante el estudio histológico de las piezas cerebrales.

Para ello, tras inyectar a los animales una sobredosis de Equithesin, se perfunden con solución salina isotónica (ClNa 0.9%) heparinizada al 1%, seguida de una solución de formaldehído al 10%. Terminada la perfusión, se extraen los cerebros con unos alicates planos y se mantienen en el frigorífico durante 5-7 días sumergidos en una solución de formol al 10%. Transcurrido este tiempo, los cerebros se colocan en un microtomo de congelación Reichert Austria Nr 333337 y se cortan en secciones de 25 micras. Los cortes se montan en portas albuminados y se tiñen mediante una modificación del método Klüver y Barrera (1953). Esta modificación emplea como único colorante cresil violeta al 0.1%. Dicho colorante tiñe las células de color rosado-violeta mientras que las fibras quedan libres de tinción.

La solución de cresil violeta se prepara de la siguiente manera: Tras preparar una solución de acetato sódico (2.72 g/100 ml de agua destilada), se disuelven 0.5 gr de violeta de cresilo en 37.5 ml de dicha solución. Posteriormente, se añaden 462.5 ml de agua destilada. Una vez disuelto el colorante, se filtra la solución y se --

añaden 5.79 ml. de ácido acético glacial.

El procedimiento de tinción es el siguiente:

- 1°/ Hidratar los cortes en etanol al 95%.
- 2°/ Aclarar en agua bidestilada.
- 3°/ Mantener los portas en la solución de cresil violeta, previamente calentada, durante 30 seg.
- 4°/ Diferenciar: dos pases por etanol al 95%.
- 5°/ Deshidratar: dos pases por etanol absoluto.
- 6°/ Limpiar: dos pases por xilol.

En los grupos intraventriculares, previamente a la perfusión, se microinyecta 1 ul de tinta china. Si la canulación es correcta, se produce una impregnación del sistema ventricular.

Una vez teñidos los cortes, se observan en un microscopio binocular Reichert Austria Nr 449619 y, usando como referencia el atlas de K \ddot{o} ning y Klippel, se localizan los planos de implantación de cánulas y electrodos.

Las fotografías de los cortes histológicos se realizan con una cámara de exposición automática Olympus PM-CBAD.

4.- METODOS ESTADISTICOS.

En los experimentos neurofarmacológicos, se utilizó un análisis de la varianza doble con un sólo elemento por casilla seguido, en los casos en los que se obtuvieron significaciones, de un test para comparar cada uno de los tratamientos con el control según el método de Dunnett (Martín de Andrés et al., 1981).

En los experimentos neuroquímicos, en los -- que se comparan los niveles de aminoácidos pre-estimulación y durante la estimulación eléctrica de la corteza prefrontal medial, se utilizó un test de homogeneidad de dos muestras (t de Student), previa comparación de varianzas (Martín de Andrés et al., 1981).

RESULTADOS

1.- ESTUDIO DOSIS-EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE LOS AMINOACIDOS ACIDICOS SOBRE LA AUTOESTIMULACION EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL.

En el estudio neurofarmacológico se han empleado tres antagonistas diferentes de los receptores de los aminoácidos acídicos: la γ -D-glutamilglicina (DGG), el 2-amino-5-fosfonovalerato (AP5) y la γ -D-glutamiltaurina (Glu-tau). La DGG bloquea a los tres tipos de receptores glutamérgicos: NMDA, kaínico y quisquálico (McGeer y McGeer, 1981; Davies et al., 1981; Watkins y Olverman, 1987). El AP5 es un antagonista competitivo de los receptores NMDA (Cotman e Iversen, 1987; Rothman y Olney, 1987) mientras que la Glu-tau ejerce su acción preferentemente frente a los receptores de kaínico y quisquálico (Watkins y Olverman, 1987; Cotman e Iversen, 1987). Por tanto, podemos dividir el capítulo neurofarmacológico en tres bloques de experimentos:

- Experimento 1: Descenso dosis-relacionado de la SS tras la inyección intraventricular e intracortical de γ -D-glutamilglicina.
- Experimento 2: Descenso dosis-relacionado de la autoestimulación tras la administración intraventricular e intracortical de 2-amino-5-fosfonovalerato.
- Experimento 3: Efectos de la microinyección intraventricular e intracortical de γ -D-glutamiltaurina.

En los tres bloques de experimentos se realizaron microinyecciones tanto intraventriculares como in

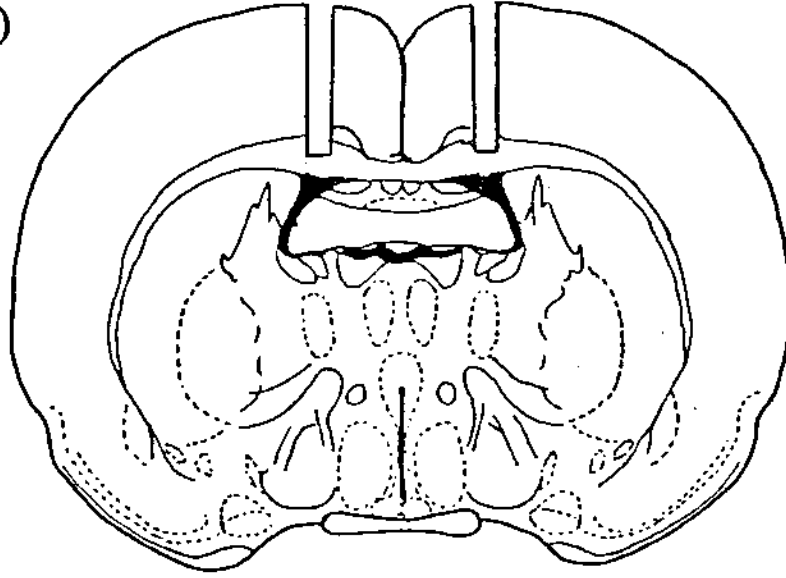
tracorticales. La localización estereotáxica de las cánulas guía intraventriculares está comprendida entre los planos estereotáxicos A 6570 u y A 5660 u (atlas de Köning y Klippel, 1967). Un ejemplo de localización puede observarse en la figura 17a. La figura 17b, por su parte, muestra un esquema de la localización estereotáxica de las cánulas guía implantadas para administración intracortical. Las cánulas intracorticales se localizaron en los planos A 11460-A 11050 u. Un ejemplo de la localización de las cánulas intraventriculares e intracorticales puede observarse en las fotografías 8 y 9 respectivamente.

Tanto en los grupos intraventriculares como en los intracorticales, se implantaron electrodos para auto estimulación en la corteza prefrontal medial. La localización estereotáxica de los electrodos de estimulación estuvo comprendida entre los planos A 11050 y 10050 u. Como puede observarse en la fotografía 10, los electrodos se situaron en las capas profundas (V y VI) del área prelímbica (Krettek y Price, 1977a).

Las figuras 18 y 19 muestran una representación esquemática de la localización de cánulas y electrodos en los grupos intracortical e intraventricular respectivamente.

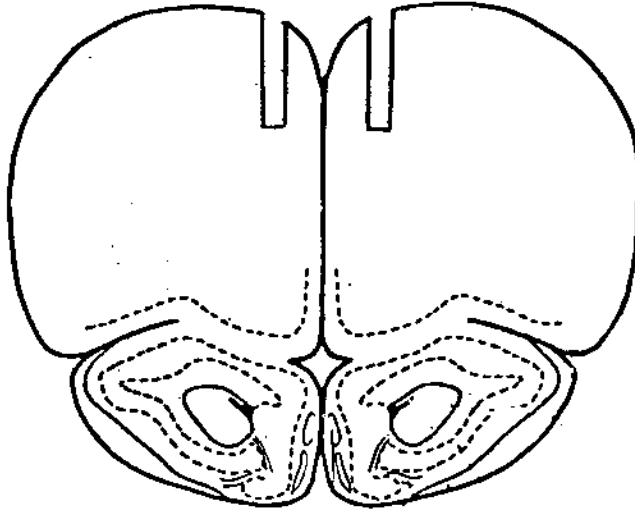
Los resultados obtenidos tras la administración intraventricular e intracortical de los tres antagonistas glutamérgicos utilizados (DGG, 2-AP5 y Glu-tau) se detallan por separado (experimento 1, 2 y 3) y pueden observarse en las tablas 1 a 12, gráficas 5 a 15. Un resumen de los resultados obtenidos tras la microinyección intracortical de la dosis máxima empleada para cada uno de los antagonistas glutamérgicos puede observarse en la gráfica 16, pag. 167).

(A)



A 6060 u -

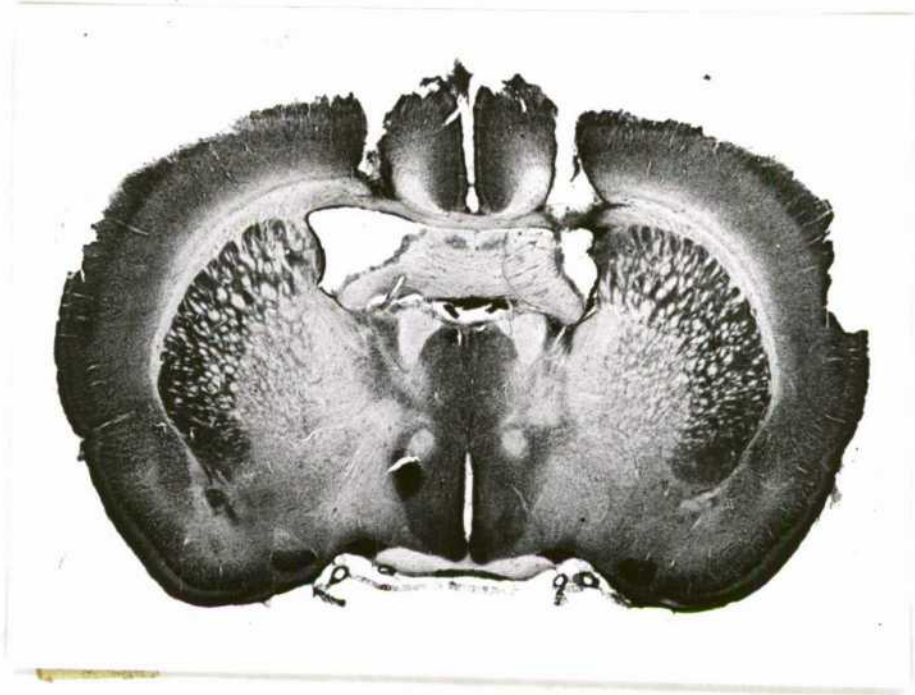
(B)



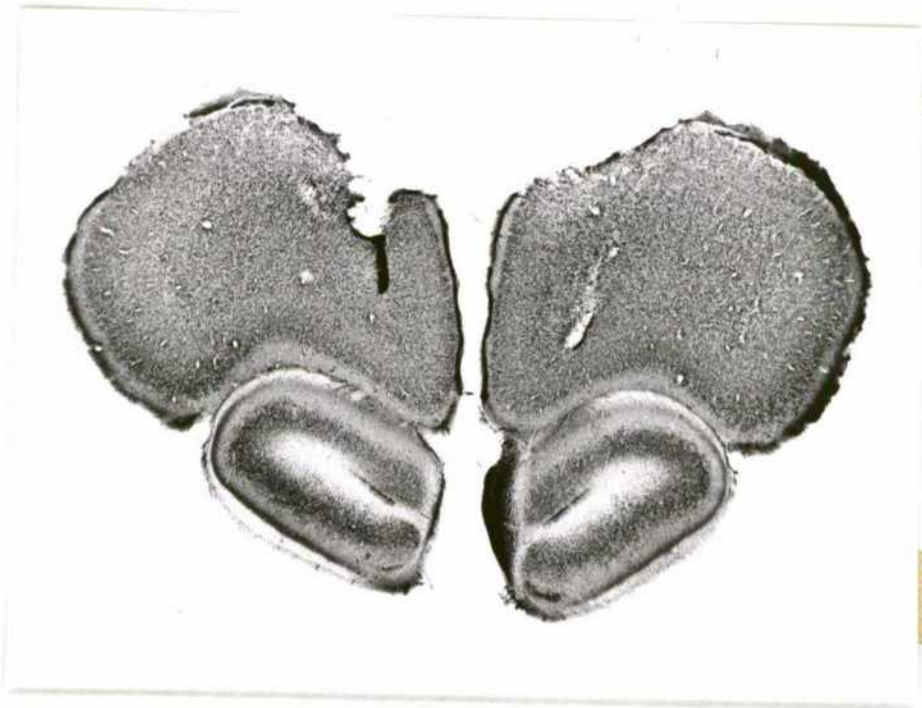
A 11050 u

FIGURA 17

Esquema de la localización estereotáxica de las cánulas utilizadas en la administración intraventricular (A) e intracortical (B) de antagonistas glutamérgicos. Figuras tomadas del atlas de Köning y Klippel -- (1967).



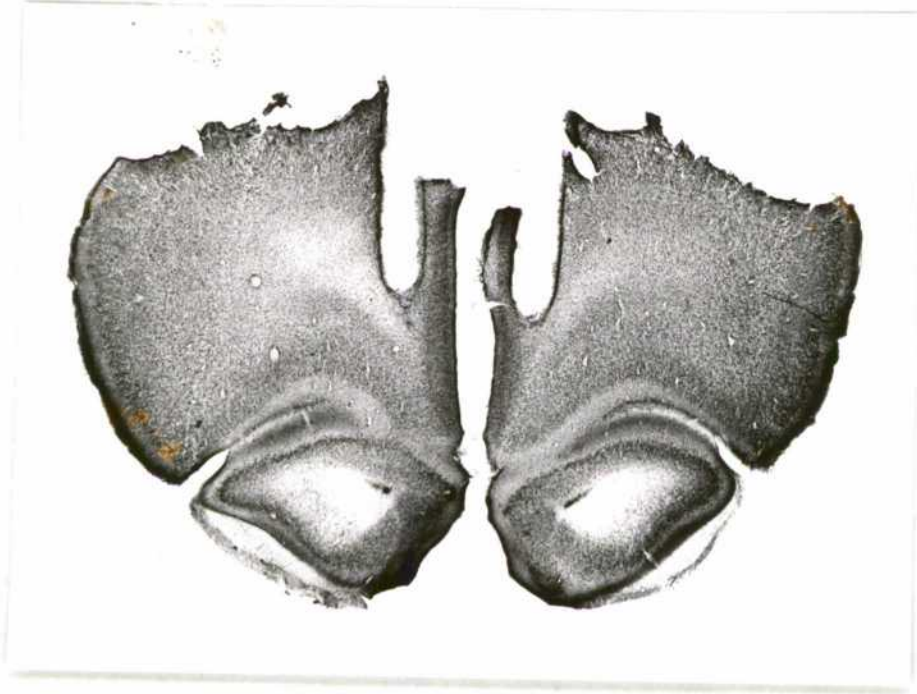
FOTOGRAFIA 8



FOTOGRAFIA 9

FOTOGRAFIAS 8 y 9

Localización y trayecto de las cánulas guía intraventriculares (8) e intracorticales (9) en dos de los animales utilizados en esta Tesis Doctoral.



FOTOGRAFIA 10

Localización y trayecto de los electrodos de estimulación en ambas cortezas prefrontales mediales - en uno de los animales utilizados en los estudios neurofarmacológicos.

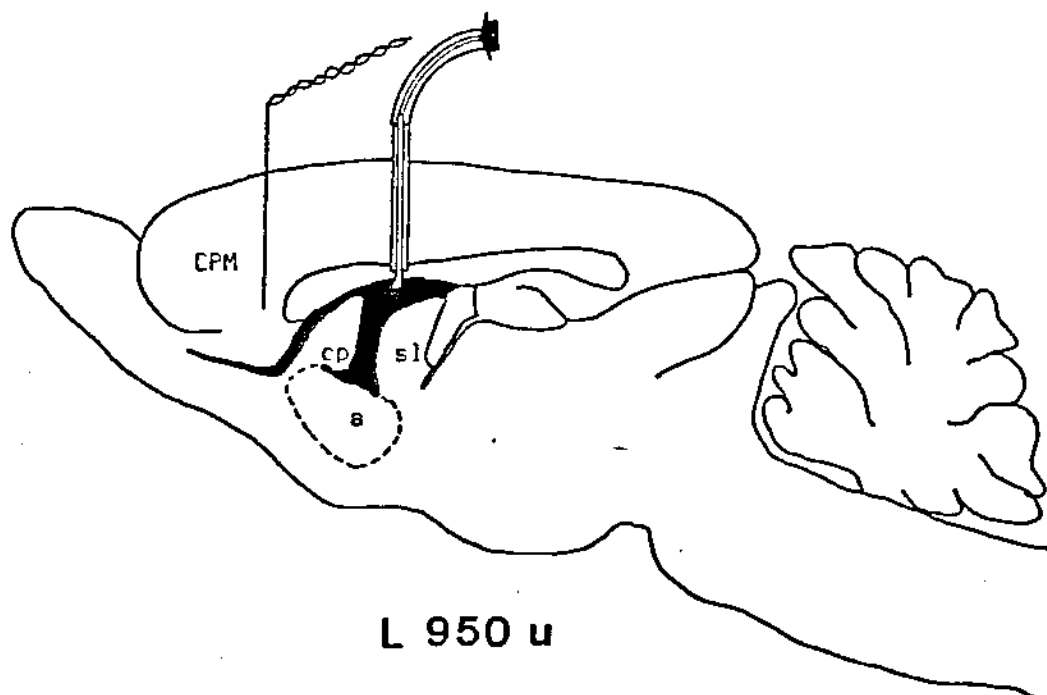


FIGURA 18

Representación esquemática de la localización de las cánulas y electrodos en los grupos intraventriculares. CPM: corteza prefrontal medial. cp: caudado-putamen. a: núcleo accumbens. sl: núcleo lateral del septum. Figura tomada del atlas de Köning y Klippel -- (1967).

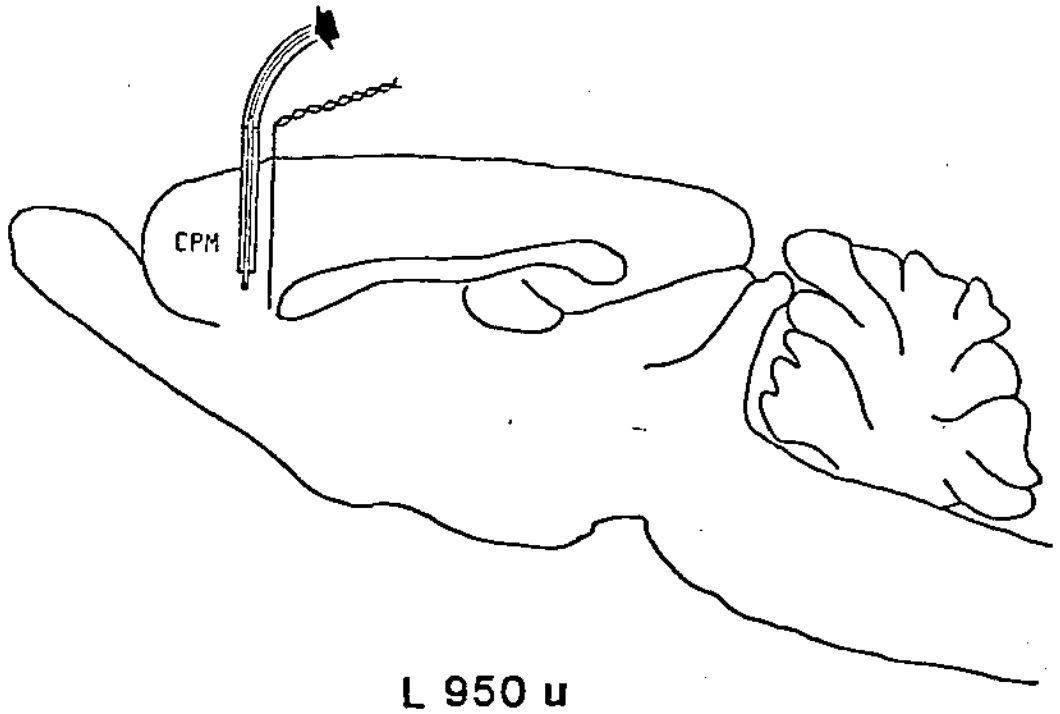


FIGURA 19

Representación esquemática de la localización de las cánulas y los electrodos de estimulación en los grupos intracorticales. CPM: corteza prefrontal medial. Figura tomada del atlas de Köning y Klippel (1987).

EXPERIMENTO 1

Descenso dosis-relacionado de la autoestimulación tras la inyección intraventricular e intracortical de γ -D-glutamylglicina (DGG).

Los efectos de la administración INTRAVENTRICULAR de DGG sobre la SS en la corteza prefrontal medial pueden observarse en la tabla 1 y la gráfica 5. Como puede en dicha gráfica, la DGG a dosis de 0.625, 1.25, 2.5 y 5 ug/ul produjo un descenso dosis-relacionado de la SS. Este descenso fué estadísticamente significativo a dosis de 1.25 ug/ul ($p < .05$), 2.5 y 5 ug/ul ($p < .01$), en los cinco primeros minutos postinyección. A dosis de 2.5 y 5 ug/ul, el descenso se mantuvo durante los 15 min. de duración del experimento. La administración intraventricular del solvente no modificó la SS en la CPM.

Similares microinyecciones intraventriculares de DGG, a las mismas dosis empleadas para la SS (0.625, 1.25, 2.5 y 5 ug/ul), no producen modificaciones significativas de la actividad motora espontánea de los animales utilizada como control (tabla 2, gráfica 6). No obstante, a dosis de 2.5 y 5 ug/ul, el animal presenta una incoordinación motora que se manifiesta en un descenso de la actividad motora espontánea de aproximadamente un 50% a la mayor dosis empleada (5 ug/ul). La administración intraventricular del solvente no modificó la actividad motora espontánea de los animales.

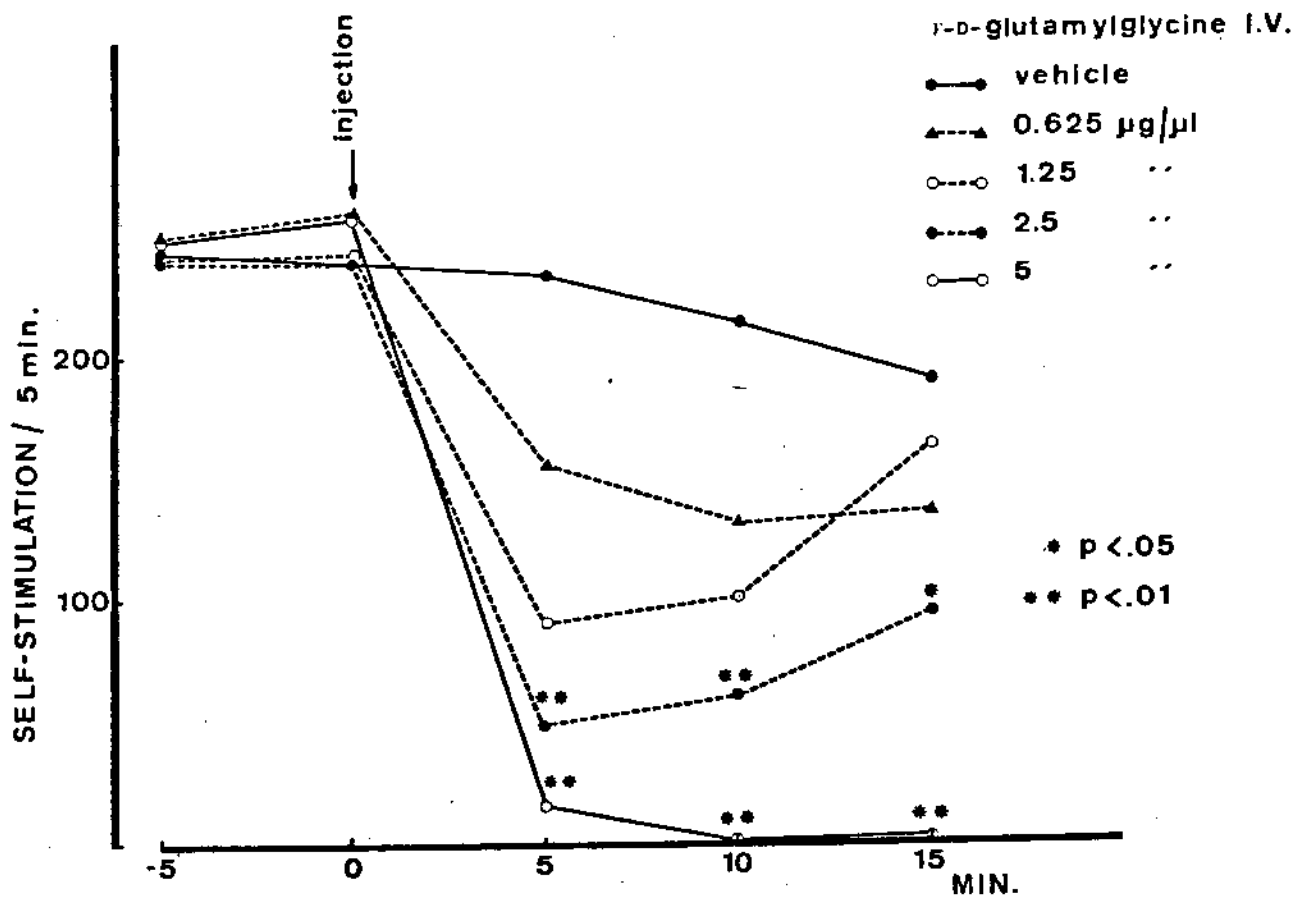
En la tabla 3 y gráfica 7, se muestran los efectos de la administración INTRACORTICAL de DGG en -

la CPM derecha. Como puede observarse en la gráfica 7, la DGG a dosis de 5, 10 y 20 ug/ul causó un descenso de la SS en la CPM ipsilateral a la inyección. Este descenso fué estadísticamente significativo durante los 5 min. postinyección para las dosis de 10 ($p < .05$) y 20 ug/ul ($p < .01$). La administración del solvente no modificó la SS en la corteza prefrontal medial.

Similares inyecciones intracorticales de DGG, a la mayor dosis empleada (20 ug/ul), no modificaron la SS en la corteza prefrontal medial contralateral a la inyección empleada como control (tabla 4, gráfica 8).

		DOSIS (ug/ul)							
		0.625		1.25		2.5		5.0	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n
<u>Minutos pre-inyección</u>									
-5		243.6±30.3	249.0±20.2	241.4±13.3	240.8±20.4	249.0±20.2			5
0		237.6±23.5	260.2±10.7	244.0± 9.4	239.6±21.8	260.2±10.7			5
<u>Minutos post-inyección</u>									
5		234.0±29.5	154.2±43.6	91.2±37.6	48.4±47.2	15.8±15.8	**	**	5
10		214.6±15.6	131.7±44.5	103.2±63.4	61.4±61.4	0.2± 0.2	**	**	5
15		203.0±10.9	136.7±50.3	163.6±68.0	94.6±57.5	3.2± 1.8	*	**	5

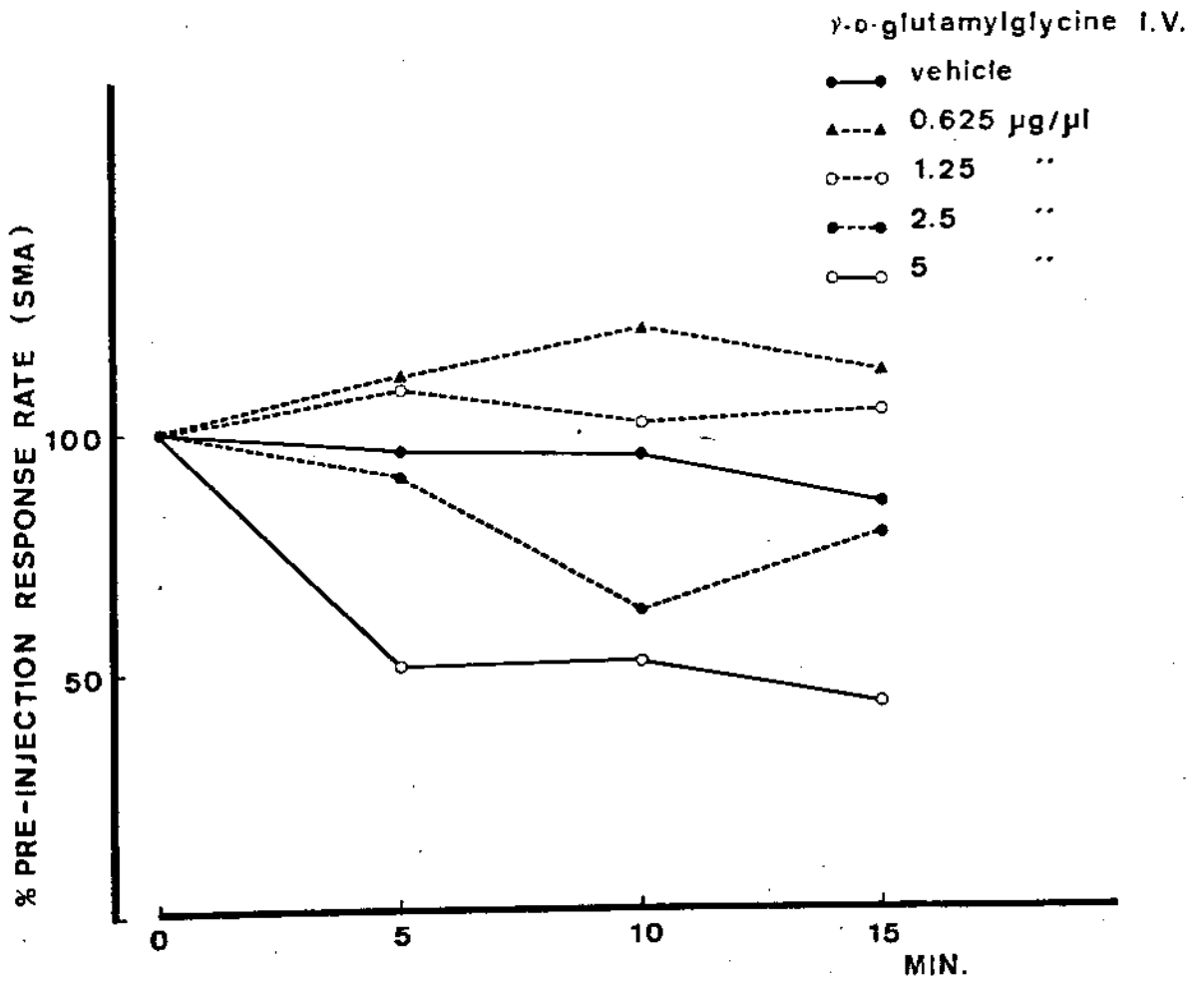
Tabla 1.- Efectos de la administración intraventricular de γ -D-glutamilglicina (DGG) sobre la SS en la CPM. La SS se registró 10 min. preinyección y 15 min. postinyección divididos en bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: error estandard de la media. n: n°de animales. * p<.05. ** p<.01.



GRAFICA 5 .- Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 1. En abscisas se representa el tiempo expresado en minutos y, en ordenadas, la tasa de autoestimulación en 5 min.

	TIEMPO (min.)			n
	5 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	10 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	15 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	
<u>DOSIS</u> <u>(ug/ul)</u>				
SOLVENTE	388.6 \pm 37.2	266.6 \pm 45.4	207.8 \pm 24.2	5
0.625	450.0 \pm 55.4	337.6 \pm 54.4	264.6 \pm 25.1	5
1.25	442.2 \pm 70.3	285.4 \pm 50.6	250.8 \pm 36.9	5
2.5	369.2 \pm 87.9	177.0 \pm 70.1	199.8 \pm 73.5	5
5.0	205.2 \pm 79.7	144.6 \pm 119.8	107.8 \pm 103.1	5

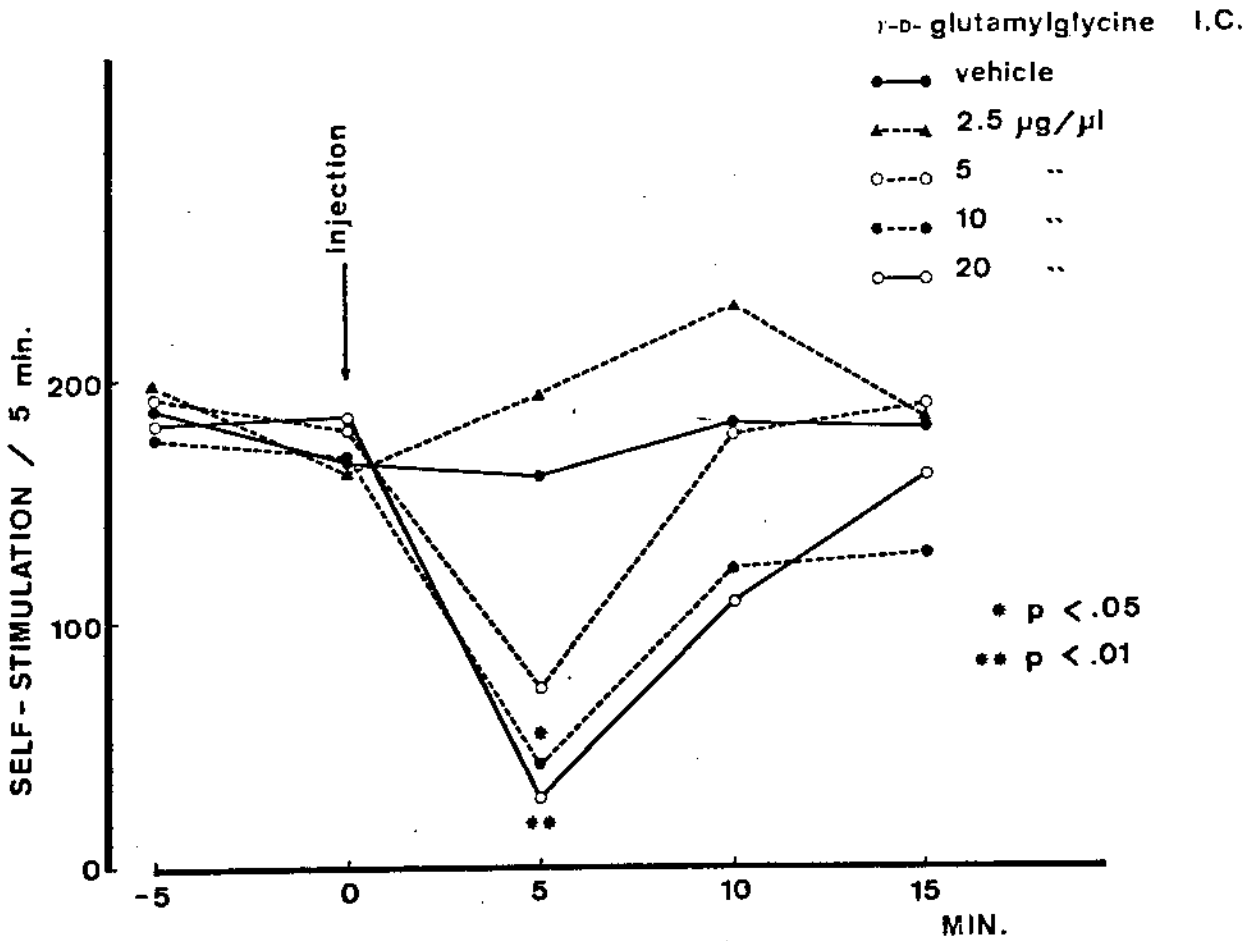
Tabla 2.- Efectos de la administración intraventricular de γ -D-glutamilglicina (DGG) sobre la actividad motora espontánea. La AMS se registró 15 min. postinyección divididos en tres bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: error estándar de la media. n: n° de animales.



GRAFICA 6 .- Representación en porcentajes del control de las medias de los datos expresados en la tabla 2. En abscisas se representa el tiempo, expresado en minutos, y en ordenadas, la actividad motora espontánea medida - cada 5 min.

		<u>DOSIS (ug/ul)</u>				
		2.5	5.0	10.0	20.0	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n
<u>Minutos pre-inyección</u>						
	-5	187.4 \pm 11.2	197.4 \pm 13.0	191.2 \pm 18.2	174.8 \pm 13.3	182.2 \pm 9.2 5
	0	163.6 \pm 23.3	163.0 \pm 15.4	181.0 \pm 24.7	167.6 \pm 11.6	181.8 \pm 17.2 5
<u>Minutos post-inyección</u>						
	5	160.0 \pm 14.2	193.3 \pm 13.7	71.6 \pm 18.6	43.8 \pm 38.4 *	29.2 \pm 17.1 ** 5
	10	183.0 \pm 19.1	229.2 \pm 19.6	180.2 \pm 39.6	122.0 \pm 49.3	108.2 \pm 51.8 5
	15	180.2 \pm 22.0	181.7 \pm 18.2	187.6 \pm 14.1	128.6 \pm 48.2	129.6 \pm 38.6 5

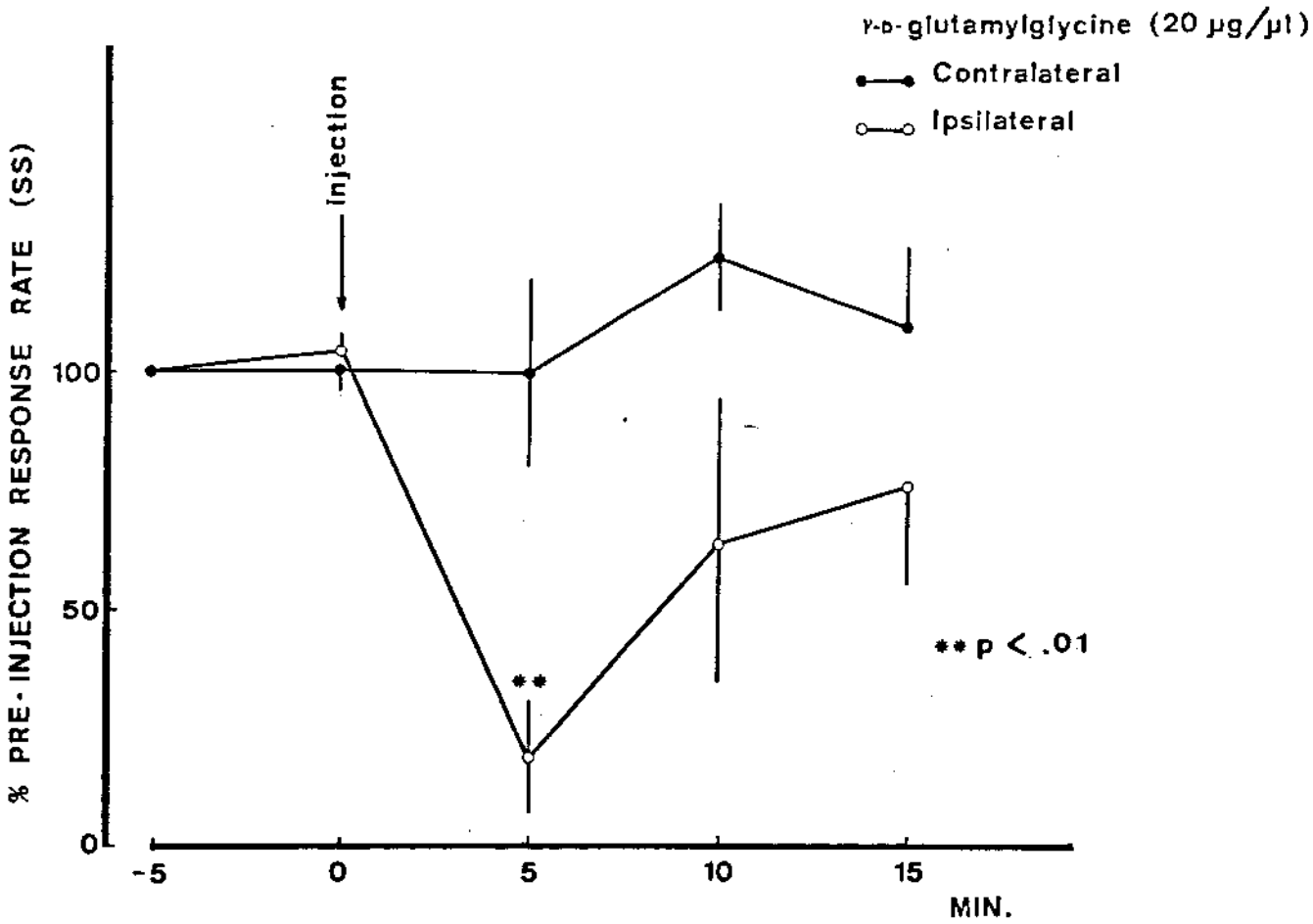
Tabla 3.- Efectos de la administración intracortical de γ -D-glutamylglicina -- (DGG) sobre la SS en la corteza prefrontal medial. La SS se registró 10 min. preinyección y 15 min. postinyección divididos en bloques de 5 min. cada uno. \bar{x} : media. SEM: error estandard de la media. n: n°de animales. * $p < .05$. ** $p < .01$.



GRAFICA 7.- Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 3. En abscisas se representa el tiempo, expresado en minutos, y en ordenadas, la tasa de autoestimulación medida cada 5 min.

	<u>CPMd</u>		<u>CPMi</u>		n
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	
<u>Minutos pre-inyección</u>					
-5	182.2 ± 9.2	-	184.0 ± 15.3	-	5
0	181.8 ± 17.2	-	158.2 ± 9.8	-	5
<u>Minutos post-inyección</u>					
5	29.2 ± 17.1	.01	172.8 ± 29.5	-	5
10	108.2 ± 51.8	-	199.8 ± 20.5	-	5
15	129.6 ± 38.6	-	163.6 ± 19.4	-	5

Tabla 4.- Efectos de la microinyección intracortical de γ -D-glutamilglicina, a dosis de 20 ug/ul, sobre la SS en la corteza prefrontal medial ipsilateral (CPMd) y contralateral (CPMi) a la inyección. La SS se registró 10 min. preinyección y 15 min. postinyección divididos en bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: error estándar de la media. n: n° de animales.



GRAFICA 8 .- Representación en tantos por ciento respecto del control de las medias expresadas en la tabla 4. En abscisas se representa el tiempo en minutos y en ordenadas la tasa de autoestimulación medida cada 5 min. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

EXPERIMENTO 2

Descenso dosis-relacionado de la autoestimulación tras la administración intraventricular e intracortical de 2-amino-5-fosfonovalerato (D-AP5).

En la tabla 5 y gráfica 9 pueden observarse los efectos de la microinyección INTRAVENTRICULAR de D-AP5 sobre la SS en la corteza prefrontal medial. Como puede observarse en la gráfica 9, el D-AP5 a dosis de 5 y 10 ug/ul produce un descenso de la SS que se mantiene durante los 15 min. de duración del experimento ($p < .01$). La administración intraventricular del solvente o de la menor dosis empleada (2.5 ug/ul) no modificó la SS en la CPM.

Similares microinyecciones intraventriculares de D-AP5, a dosis idénticas a las utilizadas para la SS, no modificaron significativamente la actividad motora espontánea de los animales (tabla 6, gráfica 10). No obstante, el animal presenta una incoordinación motora que se refleja en un aumento de la motilidad a dosis de 2.5 y 5 ug/ul y un descenso a dosis de 10 ug/ul.

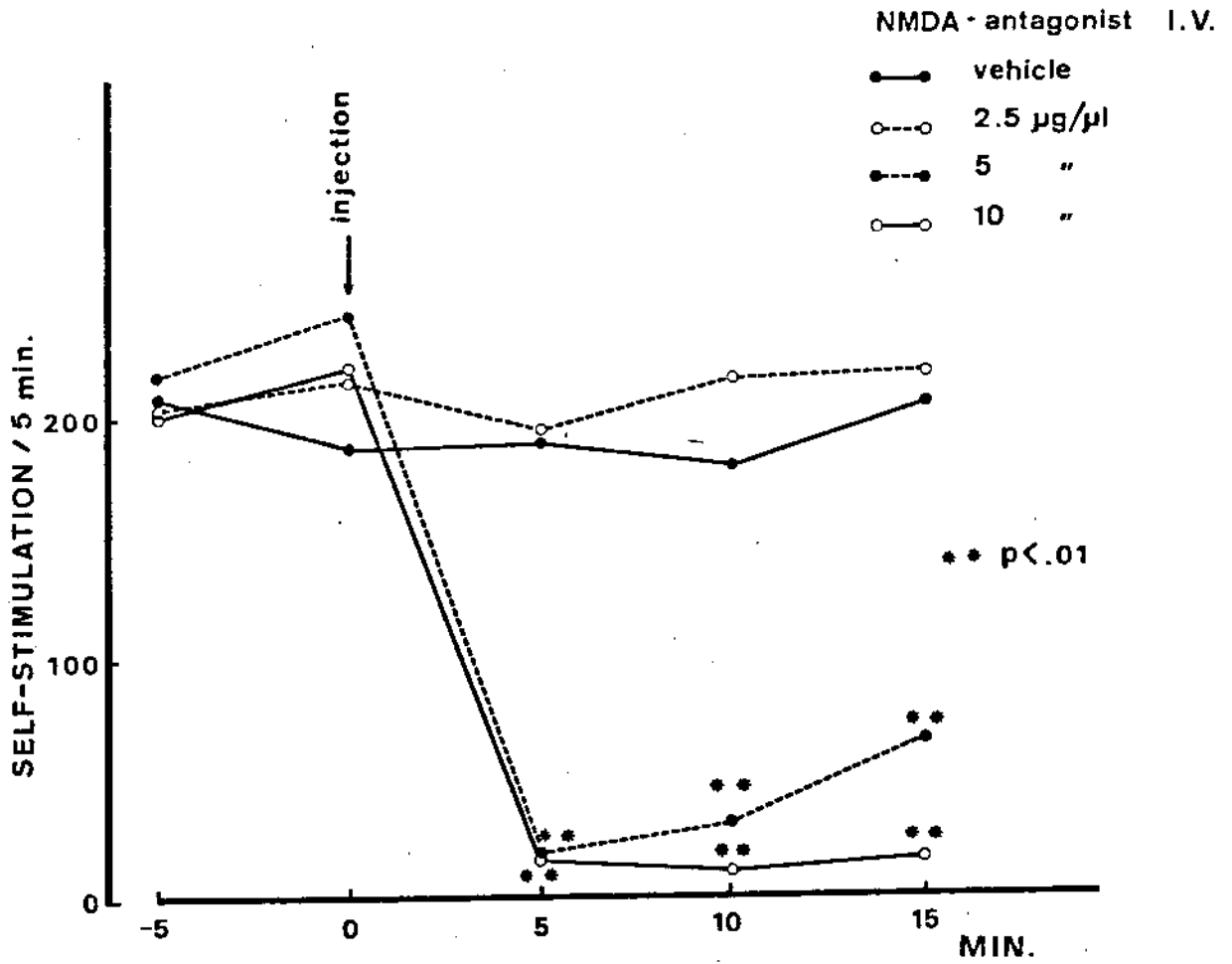
Los efectos de la microinyección INTRACORTICAL de D-AP5 sobre la SS de la corteza prefrontal medial ipsilateral a la inyección pueden observarse en la tabla 7 y figura 11. Como puede observarse en dicha figura, el D-AP5 a dosis de 10, 20 y 40 ug/ul produjo un descenso dosis-relacionado de la autoestimulación. Este descenso fué estadísticamente significativo a dosis de 40 ug/ul durante 10 min. postinyección ($p < .05$).

Trascurridos 15 min. postinyección, la SS recupera los valores control. La administración del solvente no modificó la SS en la corteza prefrontal medial.

Similares microinyecciones intracorticales - de D-AP5, a la máxima dosis empleada (40 ug/ul), no modificaron la SS en la corteza prefrontal medial contra lateral a la inyección, empleada como control (tabla 8, gráfica 12).

		<u>DOSIS (ug/ul)</u>			
		2.5	5.0	10.0	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n
<u>Minutos pre-inyección</u>					
-5		208.2 \pm 14.6	204.5 \pm 25.4	218.2 \pm 20.8	204.5 \pm 19.3
0		188.2 \pm 17.6	215.8 \pm 23.9	244.5 \pm 15.2	221.8 \pm 23.2
<u>Minutos post-inyección</u>					
5		190.5 \pm 22.7	195.0 \pm 30.7	19.7 \pm 18.1.	17.7 \pm 17.1
10		180.7 \pm 14.4	215.2 \pm 29.0	30.8 \pm 19.8	12.3 \pm 12.1
15		206.5 \pm 18.5	217.3 \pm 26.1	66.3 \pm 42.2,	17.2 \pm 16.8

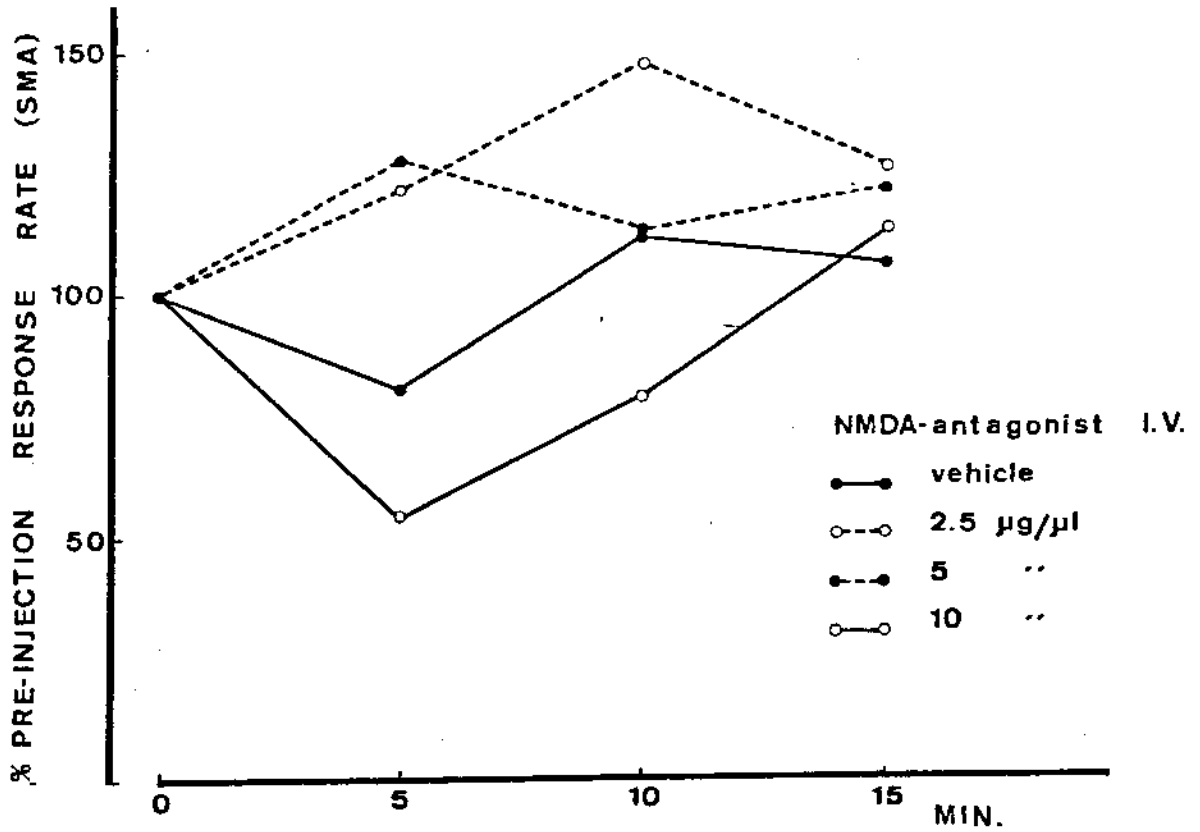
Tabla 5.- Efectos de la administración intraventricular de 2-amino-5-fosfonovaletrato sobre la SS en la CPM. La SS se registró 10 min. preinyección y 15 min. postinyección divididos en bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: error estandar de la media.
n: n° de animales. * p<.05. ** p<.01.



GRAFICA 9 .- Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 5. En abscisas se representa el tiempo, expresado en minutos, y en ordenadas, la tasa de autoestimulación cada 5 min.

	TIEMPO (min.)			n
	5 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	10 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	15 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	
DOSIS ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)				
SOLVENTE	330.3 \pm 34.6	268.3 \pm 34.3	212.3 \pm 36.2	6
2.5	499.5 \pm 87.7	395.6 \pm 76.2	279.5 \pm 27.7	6
5.0	523.2 \pm 87.0	301.0 \pm 62.7	278.5 \pm 45.3	6
10.0	217.5 \pm 59.5	207.6 \pm 48.0	236.7 \pm 73.3	5

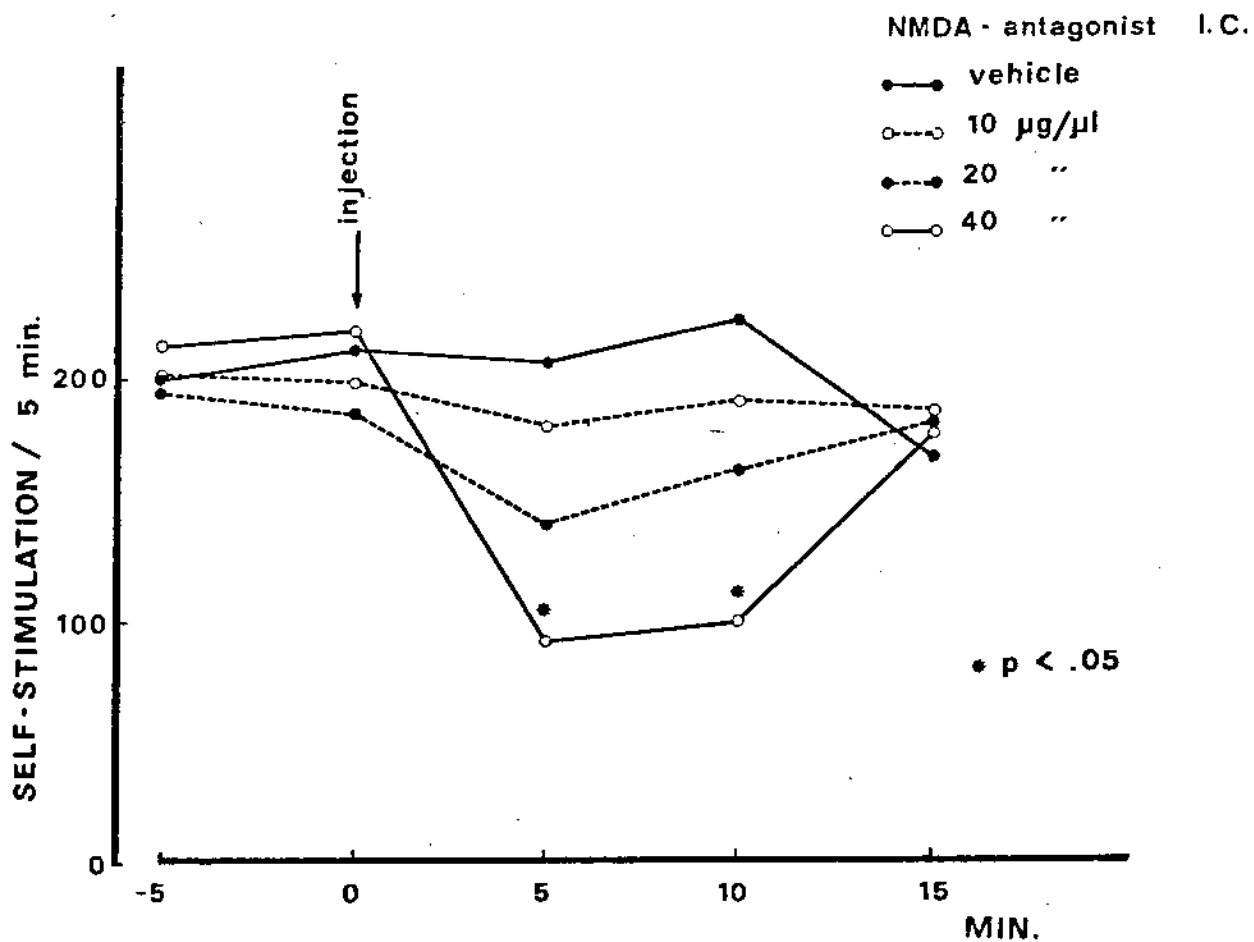
Tabla 6.- Efectos de la administración intraventricular de 2-amino-5-fosfonovalerato (D-AP5) sobre la actividad motora espontánea (AMS). La AMS se registró 15 min. postinyección divididos en tres bloques de 5 min. cada uno. \bar{x} : media. -- SEM: error estándar de la media. n: n° de animales.



GRAFICA 10.- Representación en porcentajes del control de las medias de los datos expresados en la tabla 6. En abscisas se representa el tiempo, expresado en minutos, y en ordenadas, la actividad motora espontánea medida - cada 5 min.

	<u>DOSIS (ug/ul)</u>				n
	<u>SOLVENTE</u>	<u>10.0</u>	<u>20.0</u>	<u>40.0</u>	
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	
<u>Minutos</u>					
<u>pre-inyección</u>					
-5	216.6 \pm 22.1	201.3 \pm 20.1	173.6 \pm 16.4	213.4 \pm 23.8	7
0	226.6 \pm 33.0	198.7 \pm 15.8	186.3 \pm 20.5	219.7 \pm 24.1	7
<u>Minutos</u>					
<u>post-inyección</u>					
5	207.7 \pm 23.5	180.3 \pm 40.9	141.0 \pm 36.6	91.3 \pm 28.7 *	7
10	224.3 \pm 33.5	190.6 \pm 33.0	162.1 \pm 30.9	100.3 \pm 36.2 *	7
15	166.7 \pm 26.7	187.7 \pm 33.5	185.6 \pm 26.4	177.4 \pm 25.8	7

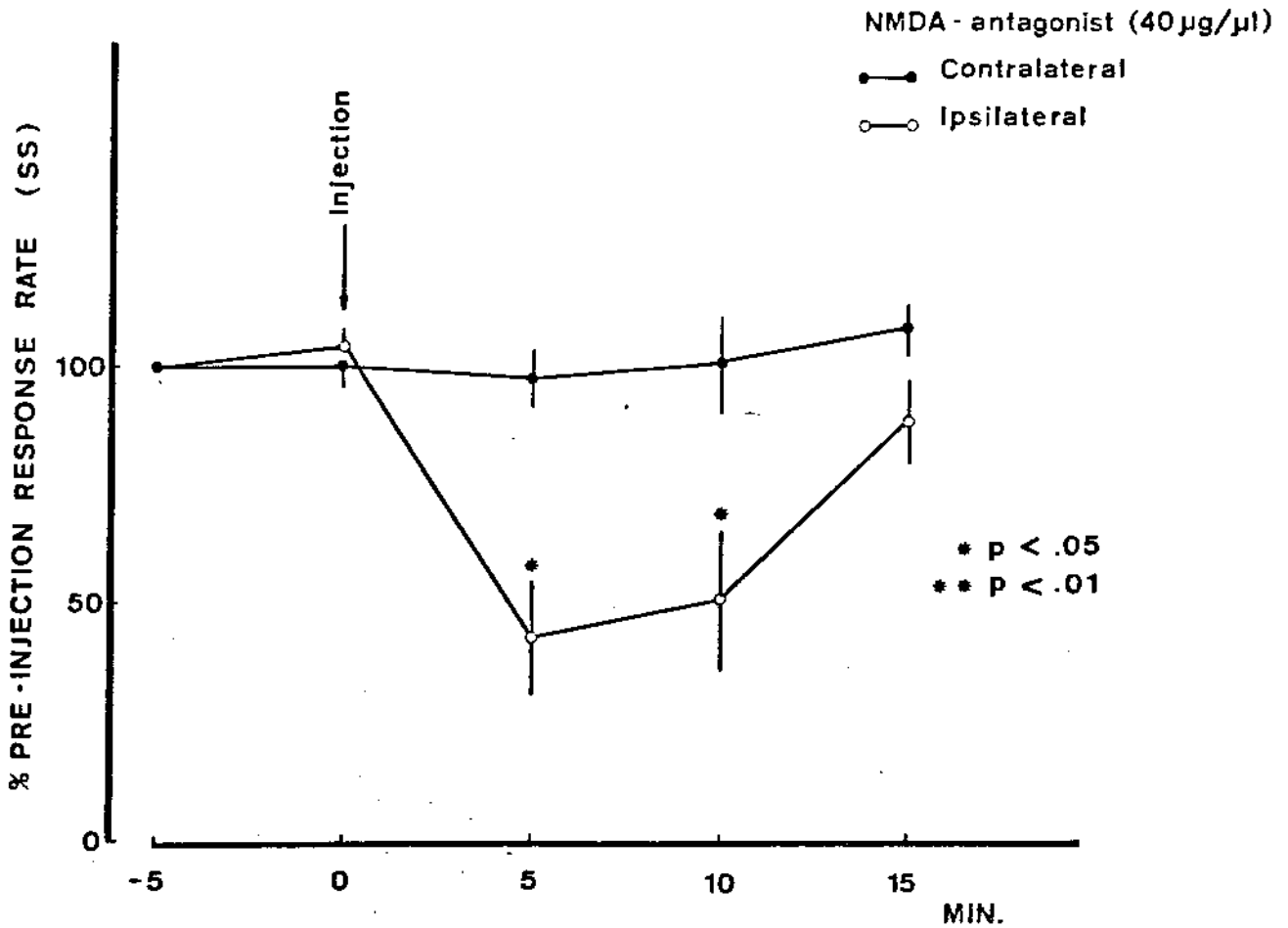
Tabla 7.- Efectos de la microinyección intracortical de 2-amino-5-fosfonovalerato sobre la SS en la CPM. La SS se registró 10 min. preinyección y 15 min. postinyección divididos en bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: error standard de la media. n: n° de animales. * p<.05.



GRAFICA 11.- Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 7. En abscisas se representa el tiempo, expresado en minutos, y en ordenadas, la tasa de autoestimulación medida cada 5 min.

	CPMd		CPMi		n
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	
<u>Minutos pre-inyección</u>					
-5	213.4 \pm 23.8	-	173.6 \pm 18.9	-	7
0	219.7 \pm 24.1	-	173.3 \pm 19.9	-	7
<u>Minutos postinyección</u>					
5	91.3 \pm 28.7	.05	168.6 \pm 15.2	-	7
10	100.3 \pm 13.7	.05	164.7 \pm 10.0	-	7
15	177.4 \pm 25.8	-	191.8 \pm 16.6	-	7

Tabla 8.- Efectos de la microinyección intracortical de 2-amino-5-fosfonovalerato, a dosis de 40 ug/ul, sobre la SS en la corteza prefrontal medial ipsilateral (CPMd) y contralateral (CPMi) a la inyección. La SS se registró 10 min. pre inyección y 15 min. postinyección divididos - en bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: error estandard de la media. n: n° de animales.



GRAFICA 12.- Representación en tantos por ciento respecto del control pre-inyección, de las medias expresadas en la tabla 8. En abscisas se representa el tiempo en minutos y en ordenadas la tasa de autoestimulación - en 5 min. Las líneas verticales representan el error estandar de la media.

EXPERIMENTO 3

Efectos de la microinyección in
traventricular e intracortical
de γ -D-glutamiltaurina (Glu-tau).

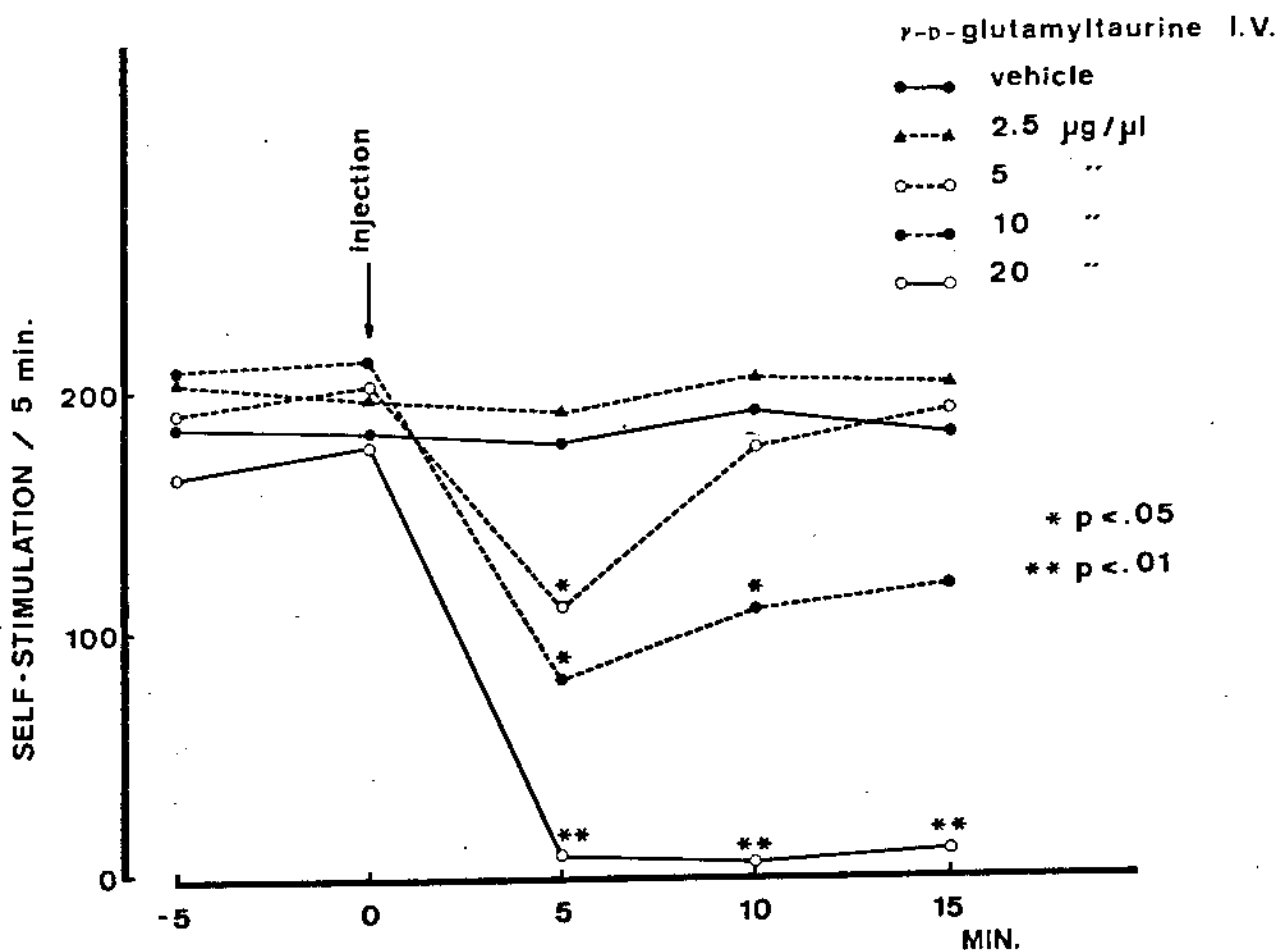
Los efectos de la administración INTRAVENTRI
CULAR de Glu-tau sobre la SS de la corteza prefrontal
medial pueden observarse en la tabla 9 y figura 13. Co-
mo se puede ver, la Glu-tau a dosis de 2.5, 5, 10 y 20
ug/ul produce un descenso dosis-relacionado de la SS.
Este descenso fué estadísticamente significativo a do-
sis de 5, 10 ($p < .05$) y 20 ug/ul ($p < .01$), en los 5 pri-
meros minutos postinyección. A dosis de 10 ug/ul, el -
descenso se mantuvo durante 10 min. ($p < .05$) mientras -
que a la dosis máxima (20 ug/ul) el descenso fué esta-
dísticamente significativo durante los 15 min. de dura-
ción del experimento ($p < .01$). La administración de sol-
vente o Glu-tau a dosis de 2.5 ug/ul no modificó la SS
en la CPM.

Similares microinyecciones de Glu-tau, a do-
sis idénticas a las empleadas para la SS, producen un
descenso dosis-relacionado de la actividad motora es-
pontánea (tabla 10, gráfica 14). Este descenso alcanzó
significación estadística a dosis de 10 ug/ul ($p < .05$)
y 20 ug/ul ($p < .01$). La administración intraventricular
del solvente no modificó la actividad motora espontá-
nea de los animales.

En la tabla 11 y gráfica 15, se muestran los
efectos de la microinyección INTRACORTICAL de Glu-tau.
Como puede observarse, la Glu-tau a dosis de 20, 40 y
80 ug/ul no modifica la SS en la corteza prefrontal me-
dial.

		<u>DOSIS (ug/ul)</u>				
		2.5	5.0	10.0	20.0	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n
<u>Minutos pre-inyección</u>						
-5		183.8±19.3	202.7±17.7	189.7±23.9	207.8±18.5	163.0±18.0
0		182.0±24.4	196.0±16.4	203.0±28.7	213.2±19.9	176.0±23.0
<u>Minutos post-inyección</u>						
5		178.7±21.4	190.8±22.0	110.3±26.6*	81.7±19.2*	8.0±7.6**
10		189.9±22.5	203.0±14.8	175.8±11.5	108.7±24.5*	4.7±3.0**
15		179.0±24.2	201.2±12.9	189.7±15.7	117.7±23.6	8.5±7.7**

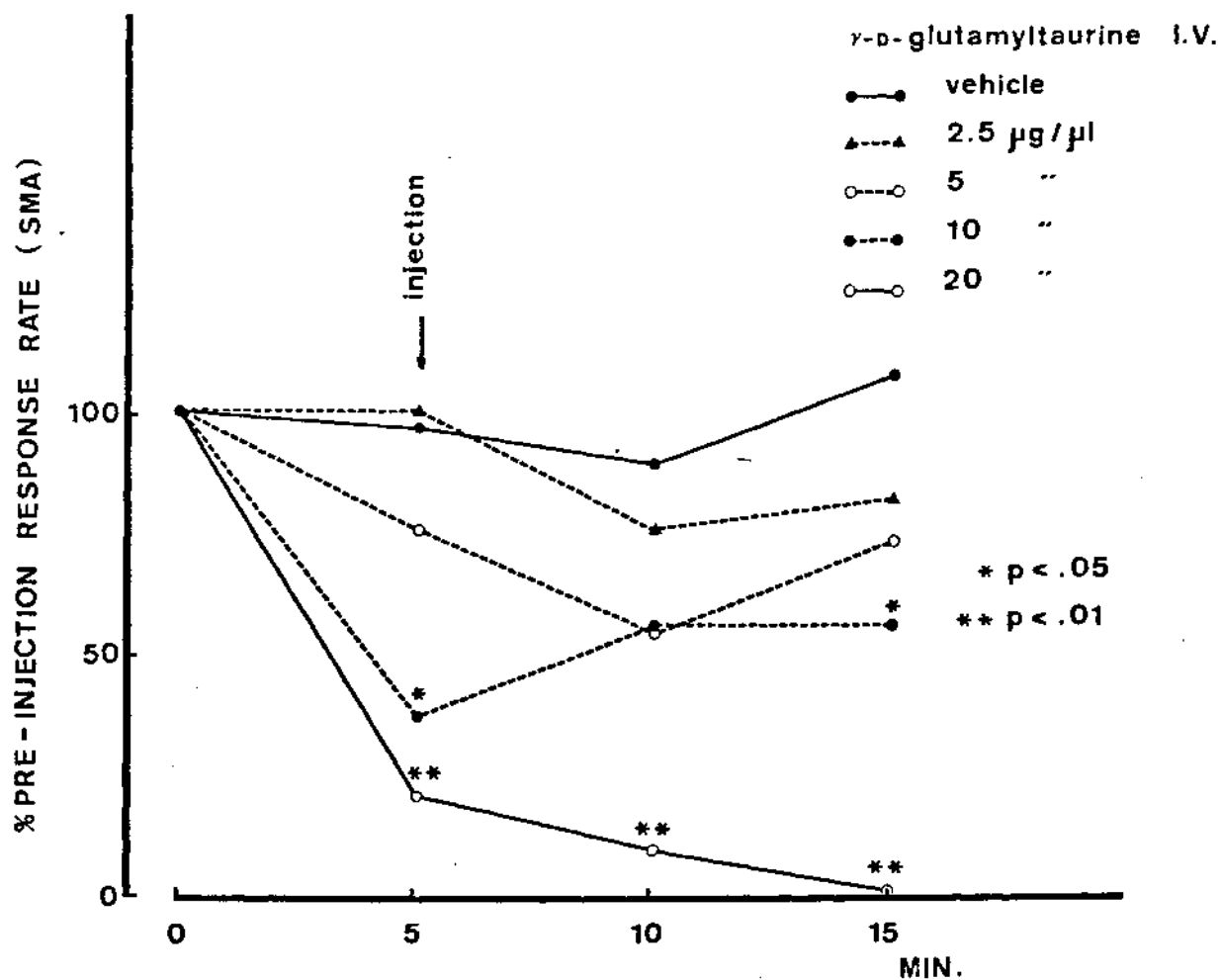
Tabla 9.- Efectos de la administración intraventricular de γ -D-glutamiltaurina (Glu-tau) sobre la SS en la CPM. La SS se registró 10 min. preinyección y 15 min. postinyección divididos en bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: error estandard de la media. n: n° de animales. * p<.05. * p<.01.



GRAFICA 13.- Representación de la media de los datos expresados en la tabla 9. En abscisas se representa el tiempo, expresado en minutos, y en ordenadas la tasa de autoestimulación medida cada 5 min.

<u>DOSIS</u> (ug/ul)	<u>TIEMPO (min.)</u>			n
	5 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	10 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	15 min. $\bar{x} \pm \text{SEM}$	
SOLVENTE	375.2 \pm 46.0	264.5 \pm 54.4	239.5 \pm 28.5	6
2.5	390.8 \pm 41.7	226.2 \pm 21.9	184.7 \pm 22.4	6
5.0	291.2 \pm 78.2	160.2 \pm 42.2	173.3 \pm 32.7	6
10.	144.3 \pm 42.3 *	151.8 \pm 40.1	131.0 \pm 28.2 *	6
20.	76.6 \pm 37.4 **	29.0 \pm 17.1 **	1.7 \pm 1.5 **	6

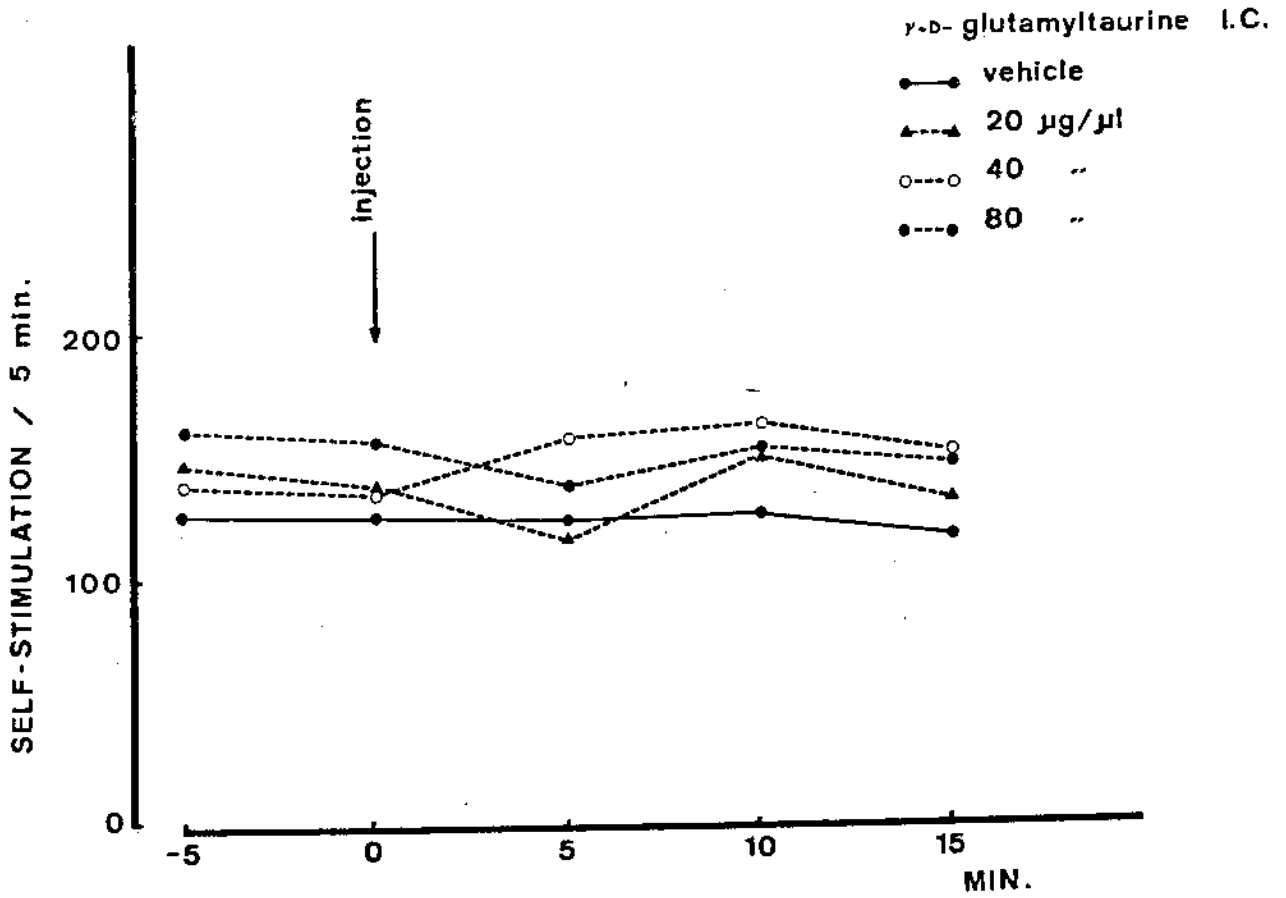
Tabla 10.- Efectos de la administración intraventricular de γ -D-glutamiltaurina (Glu-tau) sobre la actividad motora espontánea (AMS). La AMS se registró 15 min. postinyección divididos en tres bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: --- error estandard de la media. n: n° de animales. * p<.05. ** p<.01.



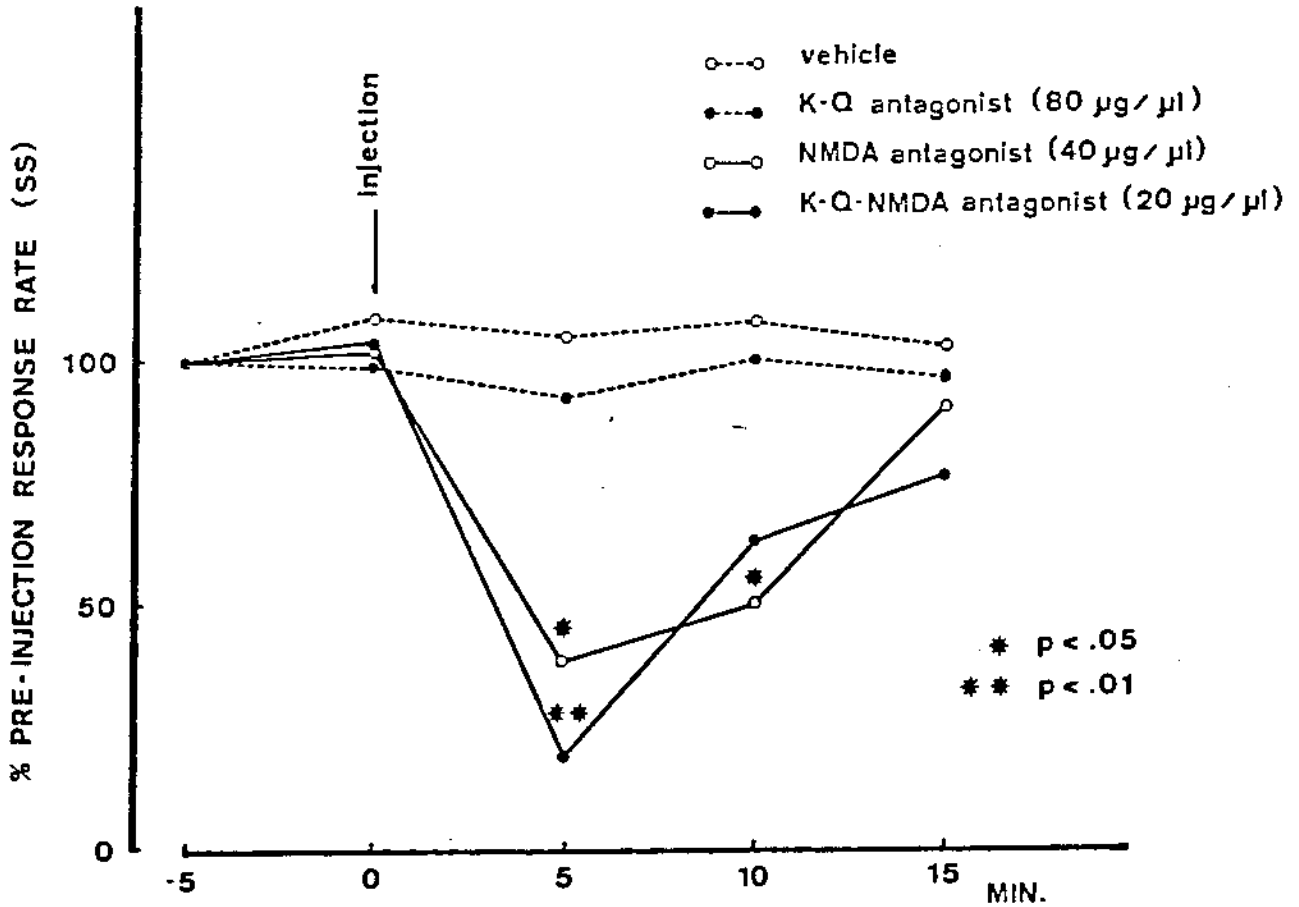
GRAFICA 14.- Representación en tantos por ciento respecto del control pre-inyección, de los datos expresados en la tabla 10. En abscisas se representa el tiempo, expresado en minutos, y en ordenadas, la actividad motora espontánea medida cada 5 min.

		<u>DOSIS (ug/ul)</u>			
		<u>SOLVENTE</u>	<u>20.0</u>	<u>40.0</u>	<u>80.0</u>
<u>Minutos</u>	<u>pre-inyección</u>	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
	<u>n</u>				
-5	8	118.9 ± 13.1	145.5 ± 19.8	137.6 ± 13.2	161.4 ± 16.0
0	8	125.7 ± 12.4	138.6 ± 15.9	135.1 ± 15.0	157.2 ± 13.8
<u>Minutos</u>					
	<u>post-inyección</u>				
5	8	124.7 ± 16.4	115.8 ± 14.2	157.4 ± 12.8	138.6 ± 21.0
10	8	125.0 ± 12.8	147.7 ± 20.7	162.2 ± 13.3	149.9 ± 16.5
15	8	116.9 ± 10.9	132.1 ± 22.1	151.4 ± 19.7	147.0 ± 15.2

Tabla 11.- Efectos de la microinyección intracortical de γ -D-glutamyl-taurina (Glu-tau) sobre la SS en la corteza prefrontal medial. La SS se registró 10 min. preinyección y 15 min. postinyección divididos en bloques de 5 min. \bar{x} : media. SEM: error estandard de la media. n: n° de animales.



GRAFICA 15.- Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 11. En abscisas se representa el tiempo, expresado en minutos, y en ordenadas, la tasa de autoestimulación medida cada 5 min.



GRAFICA 16 .- Representación de los efectos obtenidos - tras la microinyección intracortical del vehiculo y la dosis máxima administrada de cada uno de los antagonis_tas glutamérgicos utilizados (antagonista K-Q-NMDA= γ -D-glutamiltaurina; antag. NMDA= 2-AP5; antag. K-Q= γ -D-glutamiltaurina).

2.- ESTUDIO DE LOS PERFILES DE AMINOACIDOS LIBERADOS -
EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL DURANTE LA AUTOES-
TIMULACION.

Una vez dilucidada mediante técnicas neuro--
farmacológicas la participación de los aminoácidos ací-
dicos en la SS de la corteza prefrontal medial, se di-
señó el siguiente grupo de experimentos cuyo objetivo
fué estudiar los perfiles de aminoácidos acídicos libe-
rados en la CPM durante la autoestimulación.

Los resultados obtenidos de los estudios neu-
roquímicos muestran que:

1/ Los niveles basales de los aminoácidos analiza-
dos (aspartico, glutámico, glutamina, serina y glicina)
se mantienen constantes en dos perfundidos de la CPM -
realizados consecutivamente (tabla 12, figura 17).

2/ La estimulación eléctrica de la corteza prefron-
tal medial a igual intensidad y frecuencia que la de -

autoestimulación (0.3 mA de intensidad y 100 Hz de frecuencia), produce un descenso de los niveles endógenos de aminoácidos cuando se comparan con los niveles control pre-estimulación. Este descenso es estadísticamente significativo para los niveles de glutámico ($p < .05$) y glutamina ($p .01$) (ver tabla 13 y gráfica 18).

3/ Tras la estimulación eléctrica de la CPM a la misma frecuencia y doble intensidad a la de SS (0.6 mA), -- descienden los niveles de aminoácidos en la CPM alcanzando significación estadística la disminución del ácido -- glutámico ($p .02$) (ver tabla 14, gráfica 19).

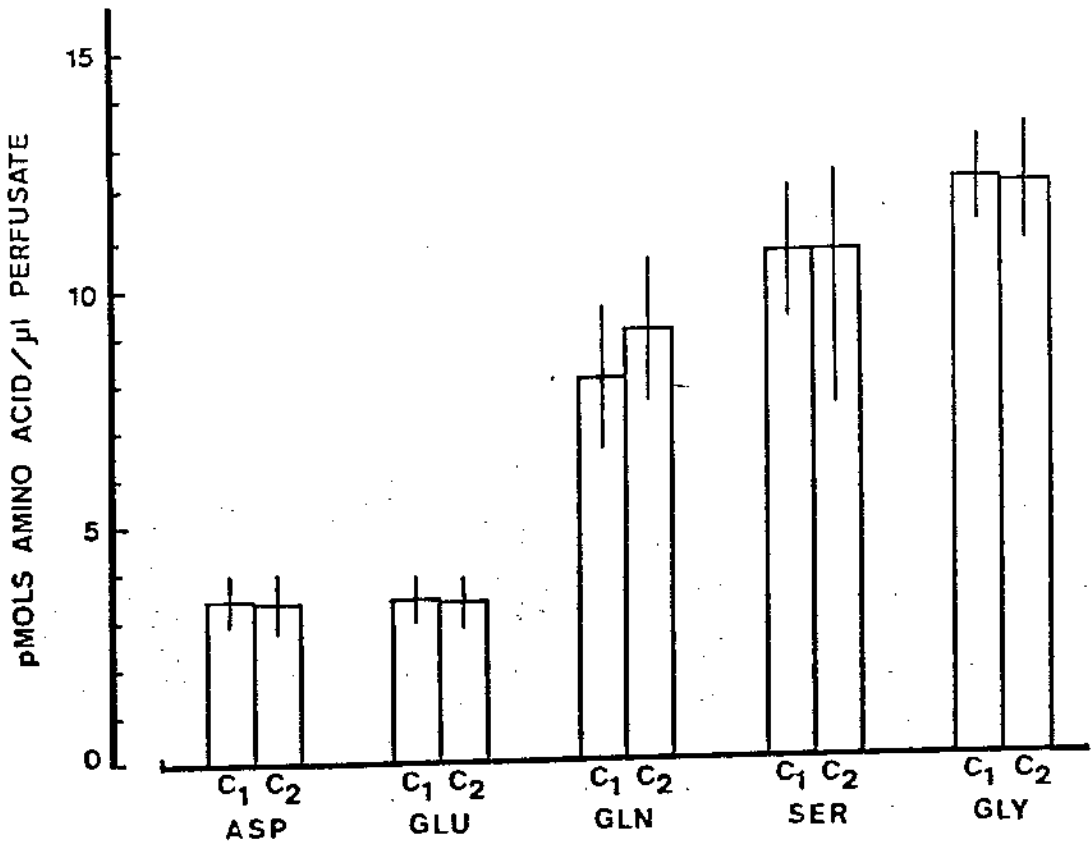
4/ La estimulación eléctrica de la CPM a la intensidad de 0.15 mA no modifica significativamente los niveles de aminoácidos (ver tabla 15, gráfica 20). A esta intensidad el animal no se autoestimula.

Un resumen de los resultados obtenidos para -- los aminoácidos acídicos (ácidos aspártico y glutámico) a las tres intensidades empleadas puede observarse en la gráfica 21.

En los experimentos neuroquímicos se implantaron electrodos para estimulación eléctrica y cánulas guía para perfusión "push-pull" en la CPM. Esta preparación -- de cánulas y electrodos es similar a la utilizada para -- la microinyección intracortical (ver figura 19, pag. 139). La localización de los electrodos de estimulación en los animales utilizados puede observarse en la figura 20. Un ejemplo de la localización de las cánulas guía y de los electrodos de estimulación puede observarse en las fotografías 11 y 12 respectivamente.

	<u>CONTROL 1</u>	<u>CONTROL 2</u>		
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	n
ASPARTICO	3.39 \pm 0.55	3.37 \pm 0.62	-	10
GLUTAMICO	3.43 \pm 0.47	3.35 \pm 0.53	-	10
GLUTAMINA	8.08 \pm 1.53	9.02 \pm 1.45	-	10
SERINA	10.65 \pm 1.38	10.65 \pm 1.61	-	10
GLICINA	12.12 \pm 0.96	11.94 \pm 1.26	-	10

Tabla 12.- Niveles basales de aminoácidos en la corteza prefrontal medial obtenidos de dos perfundidos control consecutivos. Resultados expresados en pmoles de aminoácidos/ ul de perfundido.

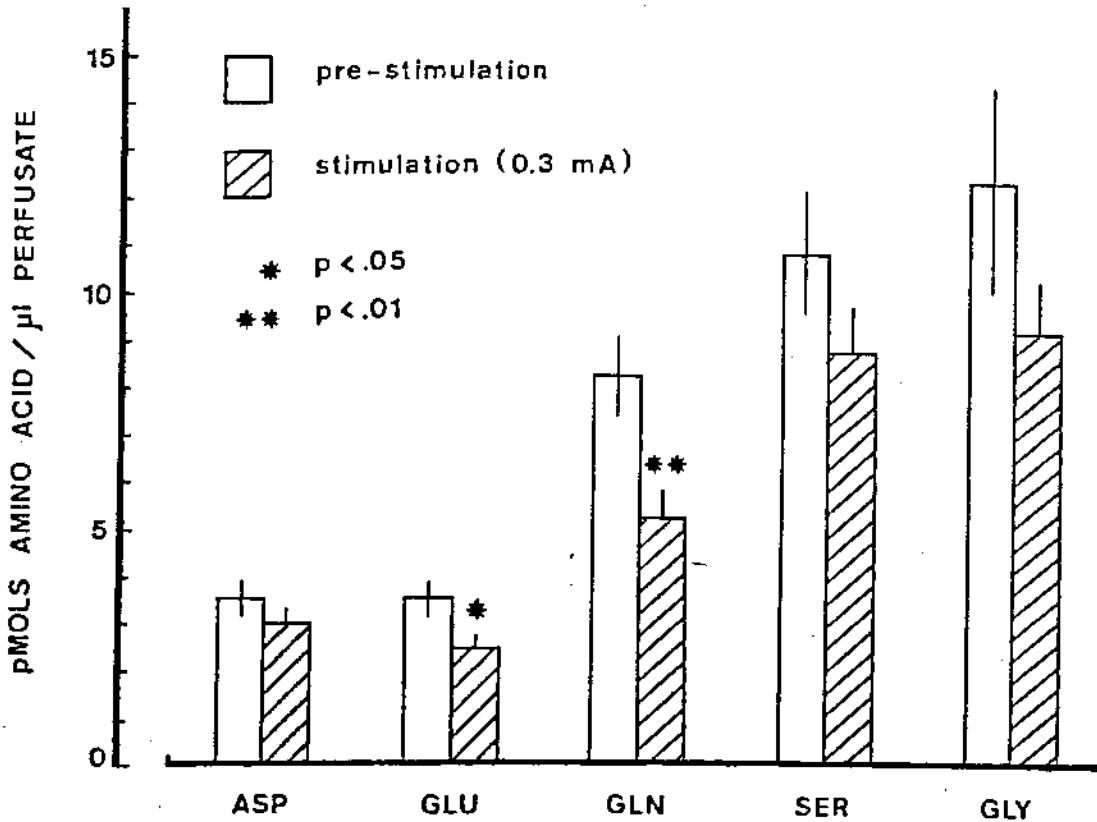


GRAFICA 17

Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 12. En ordenadas se representan -- los niveles de aminoácidos en pmoles/ ul de perfundido. En abscisas, los diferentes aminoácidos analizados. C₁: niveles obtenidos en la 1° perfusión. C₂: niveles obtenidos en la 2° perfusión. Las líneas verticales representan el error estandard de la media.

	<u>PRE-ESTIMULACION</u>	<u>ESTIMULACION (0.3 mA)</u>		
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	n
ASPARTICO	3.40 \pm 0.36	2.92 \pm 0.29	-	12
GLUTAMICO	3.41 \pm 0.34	2.30 \pm 0.29	.05	12
GLUTAMINA	8.08 \pm 0.86	5.09 \pm 0.59	.01	12
SERINA	10.66 \pm 1.33	8.54 \pm 0.99	-	12
GLICINA	12.14 \pm 1.96	8.99 \pm 1.14	-	12

Tabla 13.- Niveles de aminoácidos en perfundidos control (pre-estimulación) y durante la estimulación eléctrica de la CPM a 0.3 mA de intensidad. Resultados expresados en pmoles de aminoácidos/ ul de perfundido.

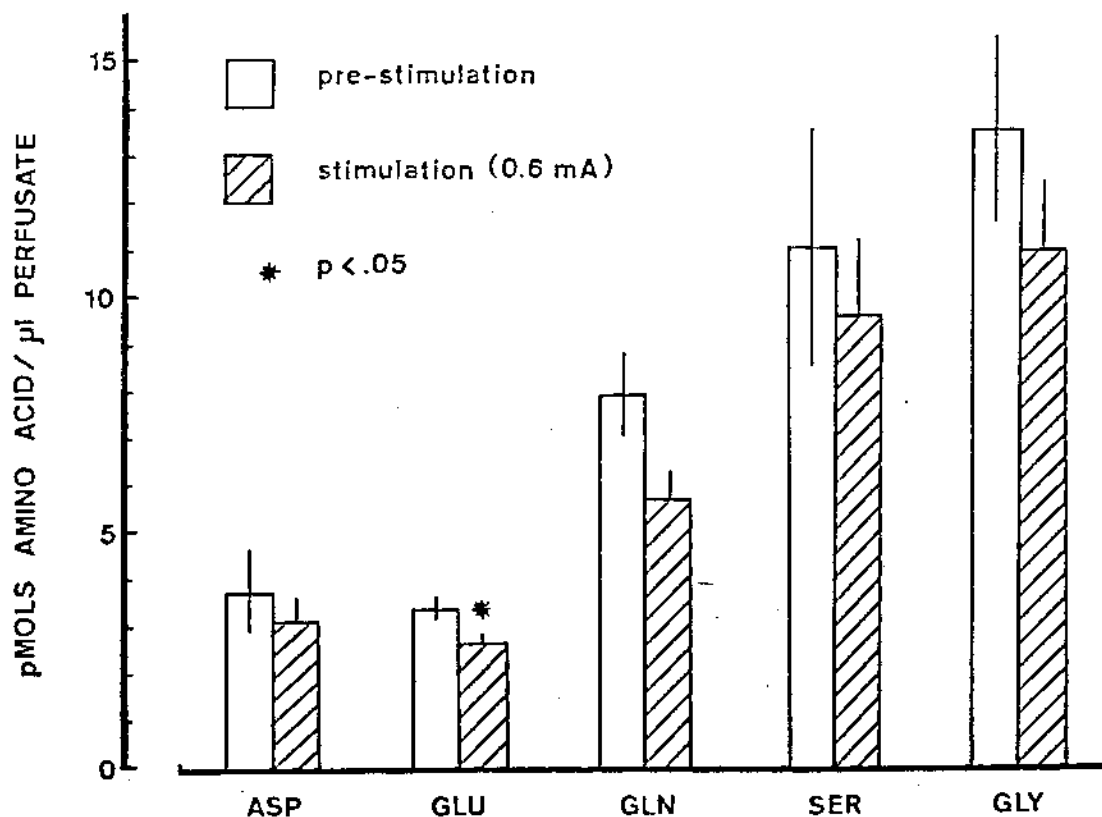


GRAFICA 18

Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 13. En ordenadas se representan -- los niveles de aminoácidos en pmols/ ul de perfundido. En abscisas, los diferentes aminoácidos analizados. Barras blancas: niveles pre-estimulación. Barras ralladas: niveles durante la estimulación eléctrica a 0.3 mA de intensidad. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

	<u>PRE-ESTIMULACION</u>	<u>ESTIMULACION (0.6 mA)</u>		
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	n
ASPARTICO	3.70 \pm 0.86	3.12 \pm 0.49	-	7
GLUTAMICO	3.35 \pm 0.22	2.61 \pm 0.18	.02	7
GLUTAMINA	7.90 \pm 0.88	5.66 \pm 0.66	-	7
SERINA	11.02 \pm 2.51	9.58 \pm 1.62	-	7
GLICINA	13.49 \pm 1.99	10.87 \pm 1.42	-	7

Tabla 14.- Niveles de aminoácidos en perfundidos control (pre-estimulación) y durante la estimulación eléctrica de la CPM a 0.6 mA de intensidad. Resultados expresados en pmoles de aminoácidos/ul de perfundido.

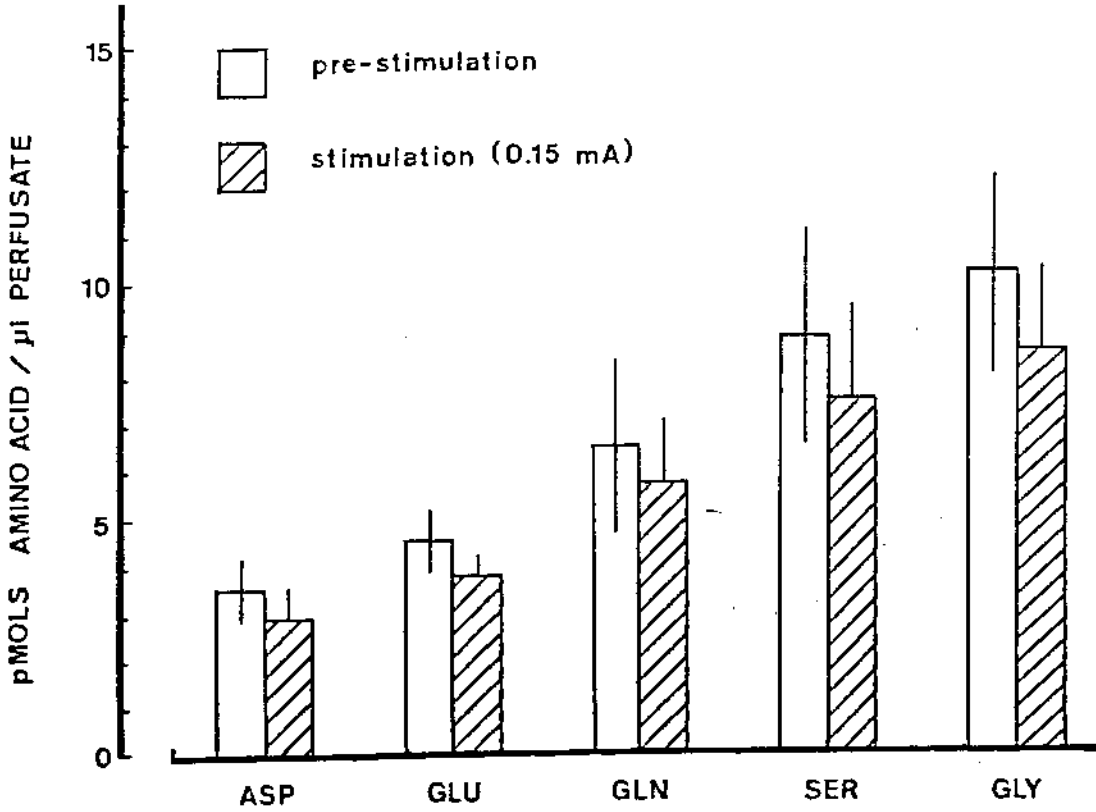


GRAFICA 19

Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 14. En ordenadas se representan -- los niveles de aminoácidos en pmoles/ ul de perfundido. En abscisas, los diferentes aminoácidos analizados. Barras blancas: niveles pre-estimulación. Barras ralladas: niveles durante la estimulación eléctrica a 0.6 mA de intensidad. Las líneas verticales representan el error estandard de la media.

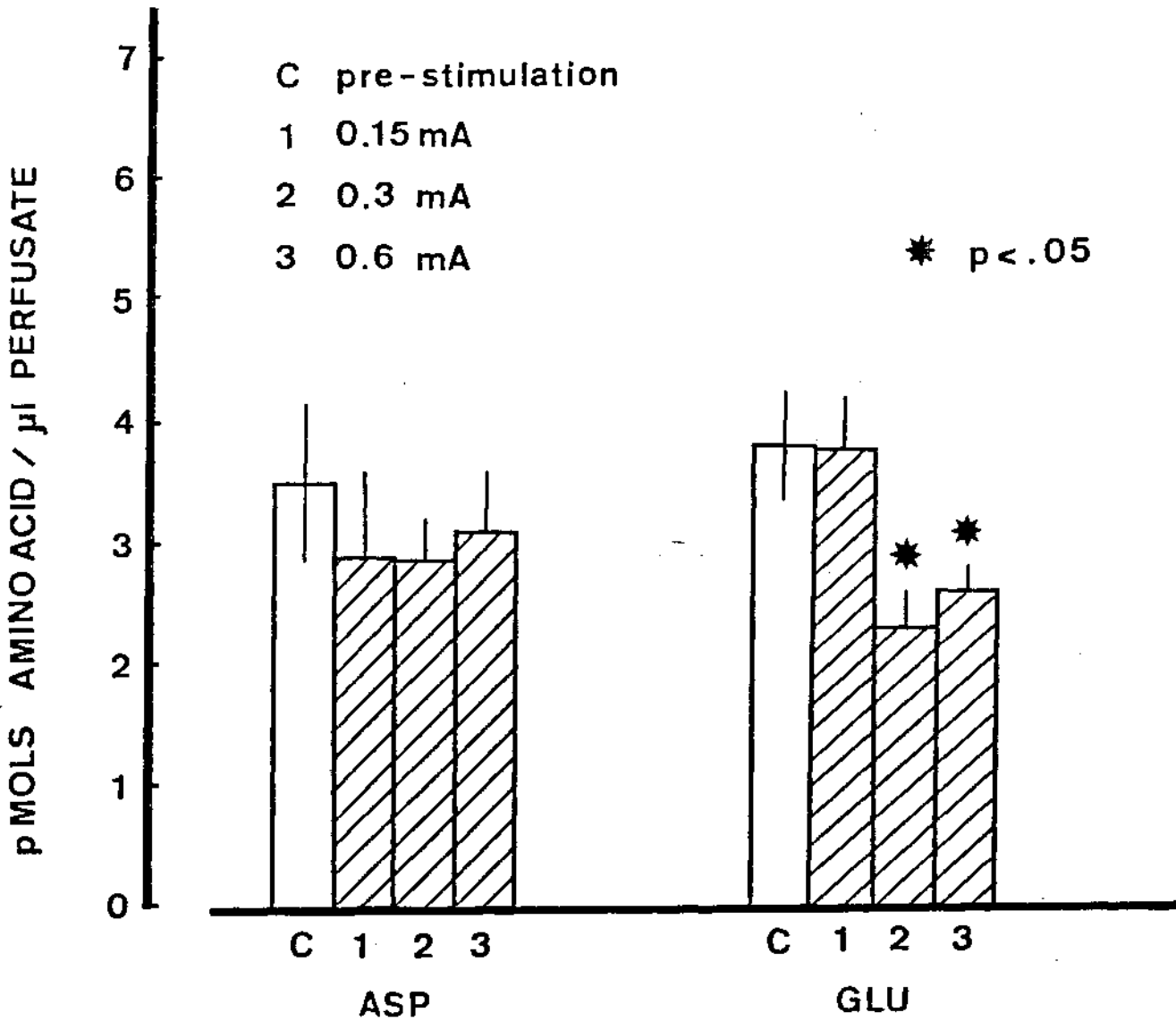
	<u>PRE-ESTIMULACION</u>	<u>ESTIMULACION (0.15 mA)</u>		
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	n
ASPARTICO	3.52 \pm 0.71	2.94 \pm 0.65	-	7
GLUTAMICO	4.52 \pm 0.61	3.77 \pm 0.44	-	7
GLUTAMINA	6.52 \pm 1.85	5.72 \pm 1.35	-	7
SERINA	8.82 \pm 2.36	7.52 \pm 2.04	-	7
GLICINA	10.15 \pm 2.11	8.48 \pm 1.76	-	7

Tabla 15.- Niveles de aminoácidos en perfundidos control (pre-estimulación) y durante la estimulación eléctrica de la CPM a 0.15 mA de intensidad. Resultados expresados en pmoles - de aminoácidos/ ul de perfundido.

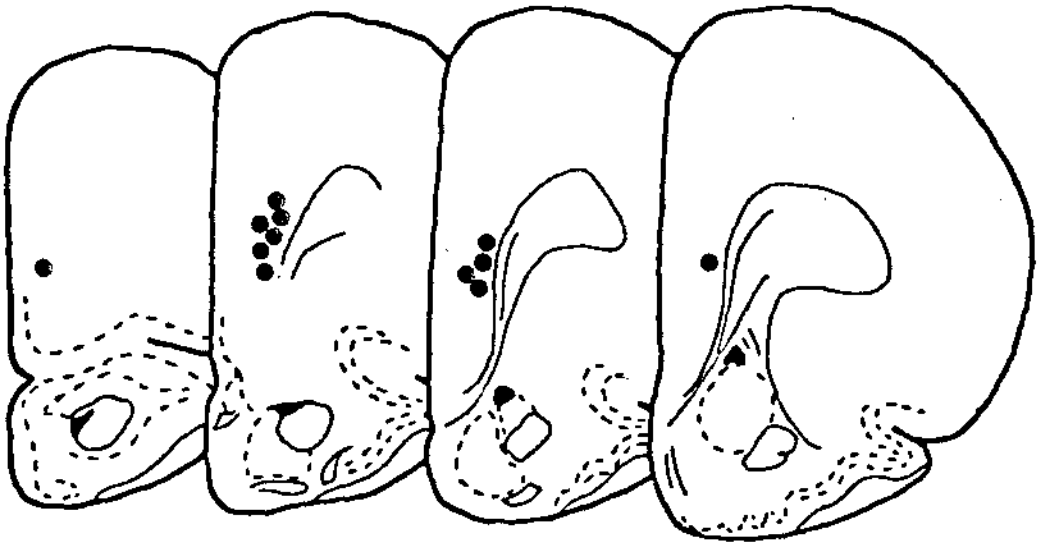


GRAFICA 20

Representación de las medias de los datos expresados en la tabla 15. En ordenadas se representan los niveles de aminoácidos en pmoles/ ul de perfundido. En abscisas, los diferentes aminoácidos analizados. Barras blancas: niveles pre-estimulación. Barras ralla--das: niveles durante la estimulación eléctrica a 0.15 mA de intensidad. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

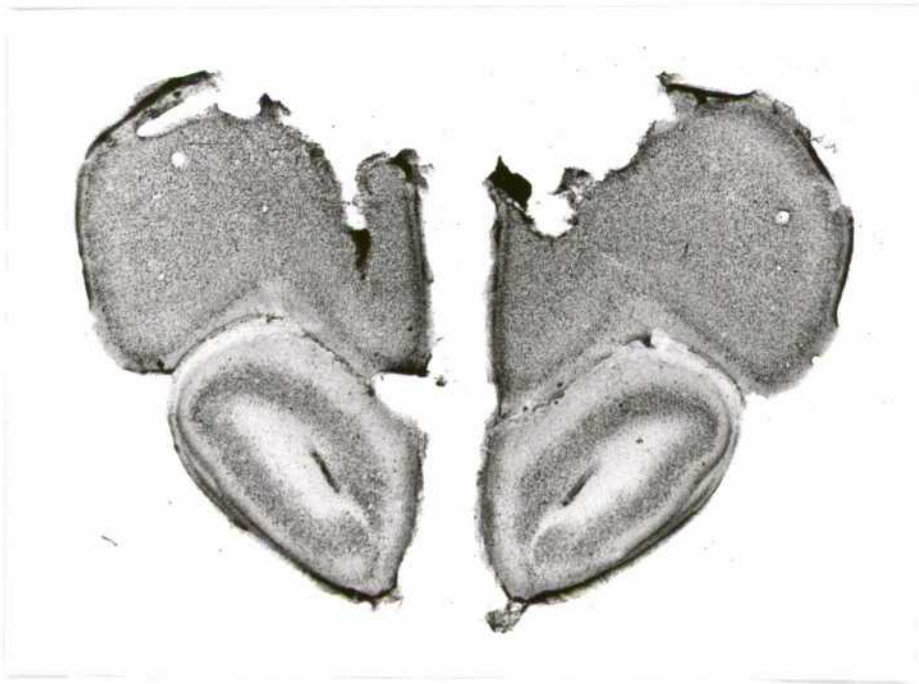


GRAFICA 21.- Representación de los niveles de aminoácidos ácidos obtenidos en la CPM en condiciones basales (C) y a las tres intensidades de estimulación utilizadas (1: 0.15 mA; 2: 0.3 mA; 3:0.6 mA). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

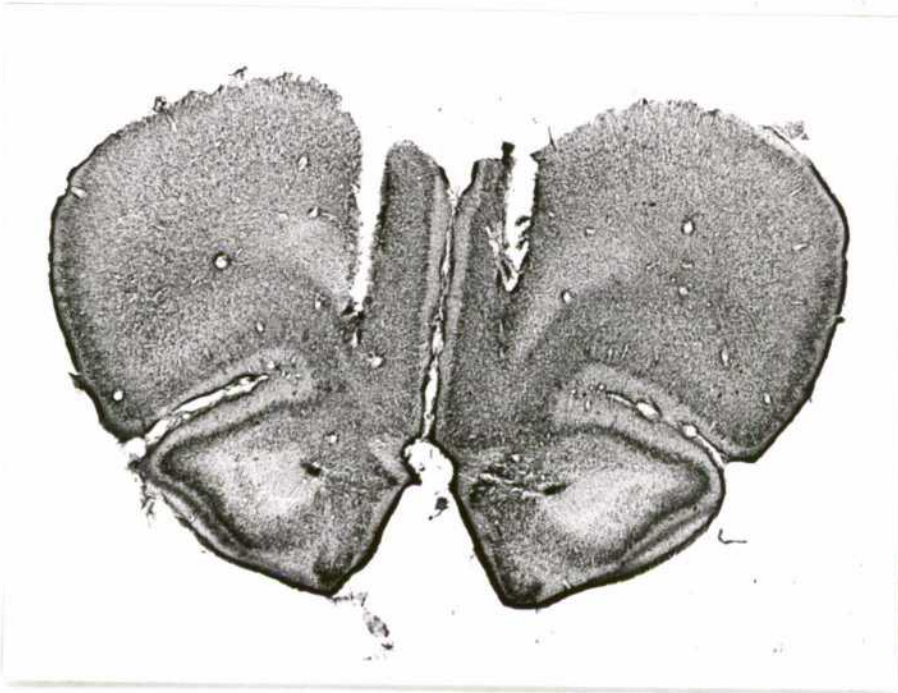


A 11050μ A 10500μ A 10300μ A 10050μ

FIGURA 20.- Representación esquemática de la localización de la punta de los electrodos de autoestimulación en la corteza prefrontal medial. n° de animales: 12.



FOTOGRAFIA 11



FOTOGRAFIA 12

FOTOGRAFIAS 11 y 12.

Localización y trayecto de las cánulas guía - intracorticales y de los electrodos de estimulación en ambas cortezas prefrontales mediales, en uno de los animales empleados en los estudios neuroquímicos.

DISCUSSION

INTRODUCCION

En los últimos veinte años, se han realizado un gran número de estudios para investigar los neurotransmisores involucrados en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990), un área cortical relacionada con memoria, motivación y aprendizaje (Kolb, 1984).

Diversos estudios, realizados utilizando técnicas neurofarmacológicas y neuroquímicas, han sugerido la participación de varios sistemas neurotransmisores posiblemente interrelacionados entre sí: dopamina, acetilcolina y sustancia P (Mora y Ferrer, 1986). Por el contrario, otros neurotransmisores presentes en la CPM como la noradrenalina, la serotonina o la colecistokinina no participan en la SS de este área cortical (Ramírez et al., 1983; Ferrer et al., 1988).

Recientemente, el capítulo de los aminoácidos neurotransmisores, particularmente los aminoácidos ácidos, ha adquirido gran relevancia. Así, se ha demostrado que la corteza prefrontal medial es un área rica en terminales glutamérgicas (Fonnum, 1984; Esclapez et al., -- 1987) y se ha sugerido la existencia de vías prefronto--corticales mediadas por aminoácidos ácidos (Fonnum et al., 1981a; Fonnum, 1984; Peinado y Mora, 1986). Además, se ha mostrado que la corteza prefrontal es una de las áreas corticales con mayor densidad de receptores glutamérgicos NMDA (Cotman et al., 1987).

Es interesante destacar, la coexistencia de receptores glutamérgicos, dopamina, acetilcolina y sustancia P (neurotransmisores involucrados en la SS de la CPM)

en las capas corticales profundas (Emson, 1978; Tassin et al., 1978; Sakanaka et al., 1983; Cotman et al., --- 1987). Así como la implicación de los receptores glutamérgicos en aprendizaje, memoria y conducta (Koek et al., 1986; Morris et al., 1986; Cotman e Iversen, 1987).

Todos estos datos sugieren la posibilidad de - que los aminoácidos acídicos pudieran jugar un papel en la SS de la corteza prefrontal medial. El objeto de la - presente Tesis fué confirmar o descartar esta hipótesis empleando tanto técnicas neurofarmacológicas (microinyec_c ción intraventricular e intracortical de antagonistas de los receptores de los aminoácidos acídicos) como neuro-- químicas (perfusión intracerebral "in vivo" "push-pull" y HPLC). Por ello, la discusión de los experimentos realizados ha sido dividida en dos bloques:

- 1.- Sobre los experimentos neurofarmacológicos.
- 2.- Sobre los experimentos neuroquímicos.

1.- SOBRE LOS EXPERIMENTOS NEUROFARMACOLOGICOS.

1.1.- SOBRE EL DISEÑO EXPERIMENTAL.

En los estudios neurofarmacológicos sobre la autoestimulación, la administración de los fármacos puede realizarse a varios niveles. Así, para demostrar la participación de un determinado neurotransmisor en la SS de la CPM se han empleado inyecciones subcutáneas -- (Mora et al., 1980b; Vives y Mora, 1986), intraperitoneales (Ferrer et al., 1983; Sabater et al., 1989), intraventriculares (Shaw et al., 1984; Ferrer et al., 1988) e intracorticales (Ferrer et al., 1983; Shaw et al., -- 1984; Ferrer et al., 1988; Sabater et al., 1989). En la presente Tesis Doctoral, la administración de los antagonistas glutamérgicos se realizó a dos niveles: intraventricular e intracortical, ya que la mayoría de los -- antagonistas glutamérgicos atraviesan con dificultad la barrera hematoencefálica (Koek et al., 1986; Cotman e -- Iversen, 1987; Kemp et al., 1987).

En las inyecciones intraventriculares la droga difunde por los ventriculos laterales actuando sobre muchas estructuras cerebrales. Por ello, las modificaciones observadas sobre la SS de la CPM tras las inyecciones I.V., pueden ser debidas tanto a los efectos de la droga sobre la corteza prefrontal (efecto directo) -- como al efecto primario sobre otras áreas cerebrales -- que, a su vez, estén relacionadas con la SS de la corteza prefrontal como por ejemplo el área ventrotegmenal (efecto indirecto) (Shaw et al., 1984; Ferrer et al., -- 1988). En este sentido, las inyecciones I.V. suponen --

una primera aproximación experimental al estudio de los efectos de los antagonistas glutamérgicos sobre la SS, ya que permiten discernir si los fármacos modifican o no la SS de la CPM (independientemente de que los efectos sean directos o indirectos).

Para dilucidar si los efectos obtenidos sobre la SS son directos, se realizan inyecciones intracorticales directamente en el punto de autoestimulación en la corteza prefrontal. Si tras la inyección intracortical se observa un descenso de la SS el efecto será directo sobre la CPM. Este es el caso de los antagonistas dopaminérgicos D_1 (Ferrer et al., 1983; Sabater et al., 1989) o de la sustancia P (Ferrer et al., 1988). Por el contrario, si tras la inyección intracortical no se observan alteraciones de la SS mientras que la administración I.V. si produce efectos, estos efectos pueden ser indirectos, como ya hemos apuntado, debido a la actuación de la droga sobre otras áreas cerebrales como sugirieron inicialmente Shaw et al., (1984) para los péptidos opiáceos.

Los antagonistas glutamérgicos poseen una acción anticonvulsivante y son relajantes musculares (Croucher et al., 1982; Turski et al., 1985; Koek et al., 1986). Por ello, para dilucidar si los efectos obtenidos son debidos a la actuación de los fármacos sobre los sustratos neuroquímicos de la SS (específicos) o debidos a una alteración motora (sedación, incoordinación, etc..) que le impida al animal autoestimularse, se utilizó un control motor (Ferrer et al., 1983; Shaw et al., 1984; Ferrer et al., 1988).

En las inyecciones intraventriculares, el control empleado fué la actividad motora espontánea (AMS)

(Shaw et al., 1984; Ferrer et al., 1988). Este control motor ha sido muy empleado tanto en las inyecciones intraventriculares como tras la administración intraperitoneal o subcutánea (Mora et al., 1980b; Ferrer et al., 1983; Ramirez et al., 1983; Vives y Mora, 1986). Si tras la administración I.V. de una sustancia se observa un descenso de la SS que no se acompaña de modificaciones de la actividad motora espontánea, este descenso puede interpretarse como específico sobre los substratos neuroquímicos de la SS. Esto ocurre por ejemplo, tras la administración I.V. de sustancia P (Ferrer et al., 1988). Por el contrario, si se obtiene un descenso de ambos parámetros (SS y AMS) no es posible discernir si el efecto es específico sobre la SS o debido a una incapacidad motora que le impide al animal autoestimularse.

En las inyecciones intracorticales, se empleó como control motor la SS en la corteza contralateral a la inyección (Ferrer et al., 1983; Ferrer et al., 1988; Sabater et al., 1989). Este control es más específico que la actividad motora espontánea ya que requiere que el animal realice una actividad motora similar a la que realiza durante la SS de la corteza prefrontal inyectada (ipsilateral). Si tras la administración de agonistas o antagonistas desciende la tasa de SS en la corteza ipsilateral pero no se modifica en la corteza contralateral, el efecto será específico sobre la SS y no debido a posibles efectos motores de los fármacos. Esta disociación de los efectos ipsi-contralaterales ha sido observada tras la administración intracortical de antagonistas dopaminérgicos D_1 (Ferrer et al., 1983; Sabater et al., 1989) o de sustancia P (Ferrer et al., 1988).

1.2.- SOBRE LOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES GLUTAMÉRGICOS.

La mayoría de los experimentos farmacológicos que muestran la participación de un determinado neurotransmisor en la SS de la CPM incluyen la inyección de fármacos agonistas y antagonistas (Mora et al., 1976a; Mora, 1978; Phillips et al., 1979; Mora et al., 1980b; Ferrer et al., 1983; Shaw et al., 1984; Vives y Mora, - 1986). En esta Tesis Doctoral, sin embargo, debido a la neurotoxicidad de los agonistas glutamérgicos se han empleado exclusivamente fármacos antagonistas (ver a -- continuación).

Actualmente, es bien conocida la neurotoxicidad de los agonistas glutamérgicos (Olney, 1978; Coyle, 1982; Rothman y Olney, 1987; Frandsen et al., 1989). El mecanismo exacto que provoca la muerte neuronal es desconocido y puede incluir varios procesos. Así, puede -- participar una prolongada despolarización neuronal con la entrada de Cl^- y H_2O en el interior celular (daño osmótico), la entrada de Ca^{++} en la célula fundamentalmente a través de receptores NMDA (daño calcio-relacionado) y, posiblemente, la participación de segundos mensajeros (Rothman y Olney, 1987).

El efecto neurotóxico de los agonistas glutamérgicos sobre las neuronas de la corteza prefrontal medial ha sido observado por Ferrer et al. (1985) y Nassif et al., (1985), tras la inyección de ácido kaínico e iboténico respectivamente. En ambos estudios se observó -- una clara pignosis de las neuronas de la CPM y una invasión glial del espacio intercelular.

Dado que el efecto neurotóxico de los agonistas glutamérgicos se produce tanto sobre neuronas glutamérgicas como no-glutamérgicas, con la administración de agonistas es imposible discernir la naturaleza química de las neuronas involucradas en la SS. Por ello, se emplearon exclusivamente fármacos antagonistas que actuaran sobre uno o varios de los receptores glutamérgicos presentes en la CPM (NMDA, kaínico o quisquálico) (Cotman et al., 1987).

Actualmente, se conocen gran variedad de antagonistas frente a los receptores glutamérgicos. Además, existen fármacos capaces de actuar frente a los tres tipos clásicos de receptores (NMDA, KA y QA) mientras que otros son selectivos frente a un solo tipo de receptor. Así, el *cis*,2,3-piperidinadicarboxilato, el dietil ester del ácido L-glutámico (GDEE) y la γ -D-glutamilglicina (DGG) actúan frente a los tres tipos de receptores (Davies et al., 1981; McGeer y McGeer, 1981; Foster y Fagg, 1984; Watkins y Olverman, 1987) aún cuando el GDEE actúa de forma preferente sobre los receptores QA (Watkins, 1981; Watkins y Olverman, 1987) y la DGG sobre los receptores NMDA y KA (Foster y Fagg, 1984; Watkins y Olverman, 1987). En esta Tesis Doctoral hemos empleado como antagonista total la γ -D-glutamilglicina debido a que es uno de los antagonistas más ampliamente utilizados y debido a su actuación frente a los tres tipos de receptores pero fundamentalmente frente a NMDA (Watkins y Olverman, 1987).

Los antagonistas específicos de los receptores NMDA han sido ampliamente estudiados en los últimos años (Cotman e Iversen, 1987; Kemp et al., 1987). Así, se ha descrito que sobre los receptores NMDA actúan gran

cantidad de sustancias existiendo tanto antagonistas -- competitivos como no-competitivos. Entre los antagonistas competitivos se encuentra el α - ϵ -diaminopimelato, D- α -aminoadipato, 2-amino-5-fosfonovalerato (2-AP5), 2-amino-7-fosfonoheptanoato (2-AP7), β -aspartilaminometil fosfonato (Asp-AMP) y 3(2-carboxipiperacina-4-il)propil-1-fosfonato (CPP) (Cotman e Iversen, 1987; Watkins y Olverman, 1987). Los antagonistas NMDA más potentes y selectivos poseen una configuración dextrógira (D) en su terminal amino y un grupo PO_3H_2 en su terminal no amino (Watkins y Olverman, 1987).

Dentro de los antagonistas no competitivos se encuentran: anestésicos como la fenilciclídina (PCP) o la ketamina, sigma opiáceos como la N-alilnoemetazocina (SKF10047) o la ciclazocina, derivados de la morfina como el dextrorfán, y otros compuestos entre los que se encuentra el etoxadrol, dexoxadrol y la dibenzociclohepteneimina (MK-801) (Kemp et al., 1987). Algunos cationes divalentes como Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} y Ni^{++} también actúan bloqueando los receptores NMDA (Watkins, 1981; Ascher y Novak, 1987).

El D,L,2-AP5 ha sido uno de los más ampliamente utilizados (Watkins y Olverman, 1987) y al poseer un grupo PO_3H_2 en su terminal no-amino es uno de los antagonistas NMDA más potentes y selectivos. Además, se han estudiado sus efectos sobre aprendizaje y conducta en relación a otras áreas cerebrales como el hipocampo --- (Morris et al., 1986). Estas razones, entre otras, motivaron su empleo como antagonista específico frente a -- los receptores NMDA en nuestro estudio.

Los antagonistas de los receptores de KA y QA

son menos conocidos. Así, aún cuando se sabe que el --- pCBPzDA, el α -D-glutamilaminometilsulfonato (GAMS) y - la γ -D-glutamiltaurina (Glu-tau) actúan fundamentalmente frente a los receptores de KA y QA también actúan, - en menor medida, frente a los receptores NMDA (Fagg, -- 1985; Cotman e Iversen, 1987; Watkins y Olverman, 1987). Además, no se conocen antagonistas selectivos que permitan distinguir entre sí ambos tipos de receptores (cotman e Iversen, 1987). El antagonista empleado en estos experimentos ha sido la γ -D-glutamiltaurina. Reciente-- mente, se ha sugerido que la 6,7-dinitro-quinixalina-2, 3-diona (DNQX) posee una acción potente y selectiva --- frente a los receptores no-NMDA (Honoré et al., 1988).

1.3.- SOBRE LOS RECEPTORES NMDA, KAINICO Y QUISQUALICO
Y LA AUTOESTIMULACION EN LA CORTEZA PREFRONTAL -
MEDIAL.

La administración INTRAVENTRICULAR de DGG (antagonista frente a los tres tipos de receptores) y de 2-AP5 (antagonista específico frente a los receptores NMDA) produce un descenso dosis-relacionado de la SS en la corteza prefrontal medial (ver gráficas 5 y 9).

Las dosis (0.625-10 ug/ul) y el volumen administrado (5 ul de disolución en cada ventrículo) se encuentran dentro del rango empleado en la literatura (Croucher et al., 1982; Simon et al., 1984; Shaw et al., 1984; TurSKI et al., 1985; Koek et al., 1986; Morris et al., 1986; Ferrer et al., 1988; Muller et al., 1988). La intensidad y frecuencia de estimulación coinciden con las empleadas por otros autores (Ferrer et al., 1983; Ramirez et al., 1983; Shaw et al., 1984; Vives y Mora, 1986; Ferrer et al., 1988; Cobo et al., 1989).

La correcta canulación de los ventrículos laterales se comprobó en dos fases del desarrollo experimental (ver apartado 3.3.1. del Material y Métodos). En primer lugar, previamente a la inyección de los antagonistas mediante la administración I.V. de angiotensina II (EpsSTEIN et al., 1970). Y, en segundo lugar, al finalizar la experimentación mediante la administración I.V. de 1 ul de tinta china y la verificación histológica de la impregnación del sistema ventricular (Shaw et al., 1984; Ferrer et al., 1988).

Similares microinyecciones intraventriculares de DGG y 2-AP5, no produjeron modificaciones significati-

vas de la actividad motora espontánea. No obstante, tras la administración de ambos fármacos se observó una cierta incoordinación motora en los animales que se refleja en un aumento no significativo de la AMS a dosis bajas y un descenso a las dosis más altas empleadas (ver gráficas 6 y 10).

En base a estos resultados, no se puede concluir que el descenso de la SS observado tras la administración I.V. de DGG y 2-AP5 sea específico y no debido a la incoordinación motora observada en los animales. Para dilucidar la especificidad de los efectos, se realizaron inyecciones intracorticales directamente en el punto de autoestimulación en la corteza prefrontal.

La administración INTRACORTICAL tanto de DGG como de 2-AP5 produjo un descenso dosis-relacionado de la SS en la corteza prefrontal ipsilateral (ver gráficas 7 y 11) mientras que la SS en la corteza contralateral no se afectó (ver gráficas 8 y 12). Estos datos sugieren que el descenso de la SS es específico ya que el animal es capaz de autoestimularse en la corteza contralateral no inyectada. Además, dicho descenso no es debido al solvente puesto que, como puede observarse en las gráficas, la administración del solvente no produce efectos sobre la SS.

Las dosis empleadas (2.5-40 ug/ul) se encuentran dentro del rango de dosis empleadas en la literatura (Coucher et al., 1982; Simon et al., 1984; Turski et al., 1985; Koek et al., 1986). El volumen de microinyección (1 ul) entra, igualmente, dentro del rango empleado por otros autores para las inyecciones intracorticales (Ferrer et al., 1983; Shaw et al., 1984; Ferrer et al., 1988; Sabater et al., 1989). El rango de difusión

de dicho volumen ha sido estimado en alrededor de 1 mm - (Myers, 1972). Dado que la distancia existente entre cánula inyectora y electrodo de estimulación es de 0.7-1 mm en el plano dorsocaudal y 0.7 mm en el plano antero--posterior, es presumible que la difusión de la droga se realice alrededor del electrodo de estimulación.

Una vez realizada la microinyección, se esperan dos minutos antes de retirar la cánula inyectora con objeto de favorecer la correcta difusión de los fármacos y evitar el reflujó a través de la cánula guía (método modificado de Bunney y Grace, 1978).

La correcta localización de cánulas y electrodos fué verificada histológicamente al terminar la experimentación. Las cánulas se localizaron en los planos extereotáxicos A 11460 y A 11050 u mientras que los electrodos de estimulación se situaron entre los planos A 11050 y A 10050 u (atlas de Köning y Klippel, 1967).

Dado que el 2-AP5 es un antagonista selectivo frente a los receptores NMDA (Cotman e Iversen, 1987) y la DGG, aún cuando es un antagonista frente a los tres tipos de receptores, actúa preferentemente frente a los receptores NMDA (Watkins y Olverman, 1987), los descensos de la SS obtenidos tras la administración I.V e I.C. de ambos fármacos sugieren la participación de los receptores NMDA en los substratos neuroquímicos de la SS en la corteza prefrontal medial de la rata.

Por el contrario, los receptores KA-QA no parecen estar involucrados en la SS de dicha área cortical. Efectivamente, aún cuando la administración INTRAVENTRICULAR de Glu-tau produce un descenso dosis-relacionado de la SS en la CPM, este descenso se acompaña de modifi-

caciones significativas de la actividad motora espontánea de los animales (ver gráficas 13 y 14), lo que sugiere que los efectos obtenidos sobre la SS son inespecíficos.

La microinyección INTRACORTICAL de Glau-tau no produce efectos sobre la SS de dicha área cortical (ver gráfica 15). Las dosis empleadas están dentro del rango de dosis utilizado en la literatura para los antagonistas glutamérgicos (Simon et al., 1984; Koek et al., 1986). Además, dosis inferiores administradas intraventricularmente sí producen efectos, como hemos indicado con anterioridad, tanto sobre la SS como sobre la AMS.

Estos datos sugieren que los receptores de --kaínico y quisqualico no están involucrados en los substratos neuroquímicos de la SS en la CPM de la rata. Por tanto, la participación de los aminoácidos acídicos en la SS de este área cortical parece estar mediada selectivamente por los receptores NMDA aún cuando los tres tipos de receptores han sido localizados en la corteza prefrontal (Cotman et al., 1987).

2.- SOBRE LOS EXPERIMENTOS NEUROQUIMICOS.

2.1.- SOBRE LA TECNICA DE PERFUSION "IN VIVO" "PUSH-PULL"

Para cuantificar las concentraciones extracelulares de neurotransmisores "in vivo" pueden emplearse -- tanto técnicas "in situ" capaces de detectar y medir los compuestos químicos directamente en el espacio intersticial (voltametría) como técnicas "ex situ" o de perfusión intracerebral que permiten recoger sustancias del espacio intersticial y analizarlas posteriormente en el exterior del cerebro (Benveniste, 1989). Entre estas últimas técnicas se encuentran el "cup" cortical descrito por McIntosh y Oborin (1953), la perfusión "push-pull" (Gaddum, 1961) y la diálisis (Bito et al., 1966; Delgado et al., 1972). Tanto la voltametría como las técnicas de perfusión intracerebral poseen la ventaja, frente a las técnicas "in vitro" de poder realizarse en el animal despierto y actuante. Por tanto, permiten conocer los niveles de neurotransmisores en tejido cerebral en condiciones fisiológicas (Abdul-Ghani et al., 1981; Benveniste, 1989). Dado que nuestro interés era conocer el perfil de los -- aminoácidos acídicos durante la autoestimulación, era necesario el empleo de una técnica "in vivo" con el animal despierto.

La voltametría permite cuantificar los niveles extracelulares de neurotransmisores a través de un microelectrodo (8-300 um) introducido estereotáxicamente en -- el área objeto de estudio (Adams y Marsden, 1982; Marsden et al., 1984). Esta técnica sería ideal para cuantificar los niveles de NT dado que no sólo se puede reali-

zar "in situ" sino que posee un tiempo de resolución muy corto (1 min. aproximadamente) (Benveniste, 1989). Sin embargo, este método sólo permite detectar NT oxidables como las catecolaminas y las indolaminas (Adams y Marsden, 1982). Otro problema sobreañadido es su falta de selectividad ya que las aminas y sus metabolitos poseen potenciales de oxidación similares (Kissinger et al., 1973; Benveniste, 1989). Este problema se ha intentado solucionar utilizando electrodos más sensibles y mediante el análisis informático de los resultados (O'Neil y Fillen, 1986).

Las técnicas "ex situ", por el contrario, permiten detectar todas las sustancias presentes en el espacio intersticial, incluyendo aminas, péptidos y aminoácidos (Besson et al., 1986; Cheramy et al., 1986; Lerma et al., 1986; Mora et al., 1986; Ramirez et al., --- 1986; Sharp et al., 1986). Para ello, sólo es necesario utilizar las técnicas de análisis adecuadas, ya que el análisis de los NT se realiza en el exterior del cerebro. Por esta razón, las técnicas "ex situ" o de perfusión intracerebral cada día son más utilizadas (Benveniste et al., 1989).

Dentro de ellas, el "cup" es el menos empleado puesto que sólo permite la perfusión de estructuras superficiales como la corteza cerebral (Moroni y Pepeu, 1984; Bradford et al., 1986; Benveniste, 1989). En la presente Tesis Doctoral, el análisis de los aminoácidos se realizó a nivel cortical. No obstante, la corteza -- prefrontal medial (área prelímbica de Krettek y Price, 1977a) se localiza en profundidad (entre 1 mm y 3 mm -- por debajo de la duramadre). Por ello, el "cup" no es la técnica adecuada para medir los niveles de aminoáci-

dos en nuestro estudio.

La técnica de perfusión "push-pull" y la diálisis permiten acceder a todas las regiones cerebrales puesto que la cánula de perfusión, a diferencia del "cup", penetra en el interior del tejido (Benveniste, 1989). Básicamente, ambos sistemas de perfusión son similares, existiendo tanto sistemas concéntricos como "side-by-side" (Gaddum, 1961; Delgado, 1962; Tossman y Ungerstedt, 1986; Sandberg et al., 1986). La única diferencia existente entre ambos sistemas es que la cánula de diálisis posee una membrana dialítica en su extremo (Delgado et al., 1984; Benveniste, 1989). Esta membrana evita el contacto directo entre el líquido perfundido y el tejido cerebral impidiendo el paso de sustancias de elevado peso molecular (Delgado et al., 1984; Justice y Neil, 1986; Benveniste, 1989). El peso molecular límite depende del tamaño de poro de la membrana de diálisis (Benveniste, 1989). Así, para el dialitrodo de Tossman y Ungerstedt (1986) es de 20.000 mientras que para el dialitrodo de Sandberg et al. (1986) es de 3.000.

La gran ventaja de la diálisis radica, precisamente, en limitar el paso de sustancias de elevado peso molecular entre las cuales se encuentran tanto proteínas como enzimas. De esta forma, evita la degradación de los NT por los enzimas y mejora el análisis no siendo necesaria la desproteínización previa de las muestras como en el caso de la perfusión "push-pull" (Delgado et al., 1984; Justice y Neil, 1986; Benveniste, 1989).

No obstante, la membrana de diálisis entorpece la incorporación de las sustancias presentes en el espacio extracelular al líquido de perfusión (Justice y Neil, 1986). Por tanto, la concentración de NT recogida en un

tiempo determinado es menor necesitando métodos de -- análisis más sensibles o un mayor tiempo de recogida pa -- ra cada muestra (aumento de los intervalos de muestreo) (Zetterstron et al., 1983; Justice y Neil, 1986). Ade -- más, los coeficientes de difusión varían dependiendo -- del peso molecular de las sustancias e, incluso, sustan -- cias con similares coeficientes de difusión pueden di -- fundir en diferente medida dependiendo de sus interac -- ciones con la membrana de diálisis (Ungerstedt, 1984). Así, los metabolitos ácidos se recogen en mayor propor -- ción que los aminos aunque posean similares coeficien -- tes de difusión. Por último, la cantidad de material re -- cogido del líquido extracelular depende del área de la membrana de diálisis, siendo mayor cuanto mayor sea el área de dicha membrana (Hamberger et al., 1983; Ungers -- tedt, 1984) y de la temperatura aumentando el coeficien -- te de difusión de 1-2% por °C (Bard y Faulkner, 1980; - Wages et al., 1986).

El sistema empleado en esta Tesis (perfusión "push-pull") presenta estos inconvenientes en menor me -- dida ya que existe un contacto directo entre el líquido de perfusión y el espacio intersticial (Myers, 1986). No obstante, presenta otros problemas como la producción - de una mayor disrupción mecánica en el tejido cerebral debido:

a.- El tamaño de la cánula de perfusión "push-pull" (1 mm aprox.) es mayor que el de la cánula de diálisis (< 0.6 mm) (Benveniste, 1989). Sin embargo, en ambos ca -- sos se mantiene intacta la barrera hematoencefálica --- transcurridos 10 min. tras la colocación de la cánula - de perfusión (Yaksh y Yamamura, 1974; Benveniste et al., 1984).

b.- El flujo de perfusión es más elevado que el empleado en la diálisis (20 ul/min) (Myers, 1986; Benveniste, 1989). Sin embargo, la diálisis también produce cierta disrupción mecánica aún cuando el flujo de perfusión es menor (2 ul/min) ya que no es infrecuente la obstrucción de la membrana por plegamiento (Tossmann et al., 1987).

Con objeto de disminuir el daño tisular al mínimo se tomaron las siguientes precauciones:

- El flujo de perfusión utilizado fué de 16 ul/min.
- Se emplearon cánulas concéntricas que se obturan con más dificultad (Myers, 1986).

- Las muestras cuyo volumen fué inferior al 3-10% del volumen infundido fueron descartadas (Yaskh y Yamamura, 1974; Delgado et al., 1984).

- La distancia existente entre la cánula "push" y la cánula "pull" fué de 0.3-0.4 mm ya que con esta distancia se produce un menor daño tisular y la eficacia del transporte de sustancias desde el tejido está cercana al "plateau" para el flujo de perfusión empleado (- Yaksh y Yamamura, 1974).

- El líquido de perfusión empleado fué solución salina isotónica (Myers, 1972) ya que está demostrado que las soluciones isotónicas producen un menor daño tisular que las hiper o hipotónicas (Yaskh y Yamamura, 1974). -

Dado que tanto con las técnicas de perfusión "push-pull" como con las técnicas de diálisis se produce un cierto daño tisular (Delgado et al., 1984), habría que cuestionarse el origen intra o extracelular de las sustancias incorporadas al perfundido. Con este fin, se han cuantificado enzimas intracelulares en los perfundidos (LDH) ó AMP_c (Greenfield et al., 1983; Korf, 1986).

Otra manera de asegurarse la integridad de las sinapsis es la perfusión de precursores radioactivos del NT objeto de estudio y la posterior cuantificación del NT en los perfundidos (Besson et al., 1986; Cheramy et al., 1986; Hery et al., 1986; Martín, 1986; Mora et al., 1986). Por último, algunos autores han incorporado al líquido de perfusión sustancias que aumentan la liberación de NT como altas concentraciones de K^+ (25-100 mM). Así, se ha obtenido un aumento de la liberación de aminoácidos neurotransmisores tanto empleando "push-pull" como diálisis, lo que sugiere la integridad funcional de las neuronas en el lugar de perfusión (Lee y Myers, 1986; Myers, 1986; Girault et al., 1986; Tossman et al., 1986a).

Independientemente de la aproximación experimental utilizada, es conveniente no recoger muestras para análisis hasta obtener unos niveles basales de NT estables (Justice et al., 1983; Sandberg et al., 1986; Young y Bradford, 1986; Benveniste, 1989). En nuestro estudio se obtuvieron niveles basales estables de aminoácidos transcurridos 20 minutos desde el inicio de la primera perfusión. Las muestras obtenidas durante ese tiempo (2 perfundidos) se descartaron.

Trascurridos tres días desde la introducción de la cánula se produce un hipertrofia de astrocitos y células inflamatorias con la consiguiente alteración de los niveles de NT liberados y de la difusión de éstos desde el tejido hasta la cánula de perfusión (Korf y Venema, 1985; Benveniste y Diemer, 1987; Benveniste, 1989). Por ello, no es conveniente realizar perfusiones crónicas durante más de tres días consecutivos, tal y como se realizó en los experimentos presentados en esta Tesis.

Además, para disminuir la reacción celular debida a la implantación crónica de la cánula, ésta fué introducida en la corteza prefrontal durante cada sesión de perfusión pero, terminada la sesión, fué retirada hasta el día siguiente.

2.2.- SOBRE EL METODO DE ANALISIS DE AMINOACIDOS (HPLC).

La metodología empleada en el análisis de aminoácidos ha ido variando a lo largo de los últimos 20 años, incluyéndose entre los métodos más utilizados la electroforesis y la cromatografía (Headcote y Davies, 1971; Moller, 1975; Wolfensberger et al., 1982; Venema et al., 1983). Dentro de los métodos cromatográficos, en un principio se utilizaron métodos cualitativos como la cromatografía en papel o la cromatografía en capa fina (Nieto, 1989). Posteriormente, se desarrollaron métodos cuantitativos entre los que se encuentran la cromatografía de intercambio iónico (Dodd y Bradford, 1974; Moller, 1975), la cromatografía de gases (Husek y Macek, 1975; Wolfensberger, 1979) y la cromatografía líquida (Lindroth y Mopper, 1979; Venema et al., 1983; Korf y Venema, 1985; Smith y Panico, 1985).

Actualmente, el procedimiento más empleado en el análisis de aminoácidos es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) debido a su gran sensibilidad (rango de femtomoles) unida a una elevada capacidad de resolución y una gran versatilidad (Lindroth y Mopper, 1979; Venema et al., 1983; Zieke, 1985; Peinado et al., 1986; Ogden y Foldi, 1986). Además, permite un reducido tiempo de análisis (10-15 min.), pequeños volúmenes de muestra, métodos simples de derivación y posee un coste menor que otros métodos cromatográficos (Venema et al., 1983; Zieke, 1985; Peinado et al., 1986; Ogden y Foldi, 1986). Otra de sus ventajas radica en la posibilidad de separar los aminoácidos acídicos de sus respectivas amidas (asparragina y glutamina) (Wolfensberger, 1979; Huseck, 1982).

La cromatografía de intercambio iónico también ha sido ampliamente utilizada en el análisis de aminoácidos pero requiere mayor cantidad de muestra, necesita un mayor tiempo de análisis y posee una menor sensibilidad (Delgado et al., 1984; Ogden y Földi, 1986). La sensibilidad se ha conseguido aumentar mediante la realización de una derivación post-columna con OPA y la utilización de detectores de fluorescencia (Ferraro y Hare, 1984). No obstante, el mantenimiento de un autoanizador es más costoso y complicado ya que requiere una continua preparación de soluciones y reactivos (Blau, 1981; Joseph y Davies, 1983).

El análisis de aminoácidos por cromatografía gas-líquido sólo puede realizarse tras la conversión de éstos en derivados volátiles y estables (Blau, 1981). El proceso de derivación es complejo y laborioso (Huseck, 1982). Además, algunos tratamientos de derivación (formación de N-heptafluorobutírico derivados o trimetil-silil esterés) convierten al ácido aspártico y glutámico en asparagina y glutamina respectivamente (Wolfensberger, 1979). Como consecuencia, no es posible cuantificar los niveles de aminoácidos ácidos independientemente de sus amidas. Este problema se consiguió solucionar mediante el empleo de métodos de derivación más suaves que no requieren altas temperaturas, no obstante, el proceso de derivación continúa siendo laborioso (Huseck, 1982).

En el presente estudio el método de análisis empleado ha sido HPLC tanto por la disponibilidad del material apropiado en nuestro laboratorio como por sus múltiples ventajas entre las que cabe destacar su sensibilidad y un reducido tiempo de análisis (Zielke, 1985; Peinado et al., 1986; Ogden y Foldi, 1986).

2.2.1.- SOBRE LA DERIVACION Y DETECCION DE LOS AMINOACIDOS.

Para la detección de los aminoácidos es necesaria una derivación previa. Esta derivación puede realizarse mediante diferentes métodos entre los cuales se encuentra la formación de PICT-derivados (feniltioisocianato) (Heinrikson y Meredith, 1983), FOMC-derivados (cloruro de 9,fluorometiloxicarboxilo) (Einarson, 1985) y OPA-derivados (o-ftalaldehído) (Allison et al., 1984).

La formación de PICT-derivados requiere un proceso largo con varios pasos de secado al vacío y la adición de reactivos en varios momentos del proceso. Además, es menos sensible que el OPA y FMOC (Ogden y Foldi, 1986).

La gran ventaja de los FMOC-derivados es su gran estabilidad (superior a las 30 horas) (Ogden y Foldi, 1986). Sin embargo, el espectro de fluorescencia del reactivo está muy cercano al de los derivados. Como consecuencia, aparecen en los cromatogramas amplios picos que interfieren con los picos de los aminoácidos (Ogden y Foldi, 1986). Este inconveniente puede evitarse eliminando el exceso de FMOC y de sus productos de hidrólisis antes de introducirlos en la columna, lo que impide su empleo post-columna (Ogden y Foldi, 1986).

Los OPA-derivados requieren un tiempo de reacción corto (fácil obtención) y poseen una elevada fluorescencia (Lindroth y Mopper, 1979; Venema et al., 1983). Por ello, es un método muy sensible para el análisis de aminoácidos acoplado a un detector de fluorescencia (Korf y Venema, 1985; Smith y Panico, 1985) o electroquímico (Joseph y Davies, 1983; Allison et al., 1984; Peinado et

al., 1986). El detector electroquímico, sin embargo, es muy sensible a los cambios en la composición de la fase móvil (Allison et al., 1984; Peinado et al., 1986). Como consecuencia, ha sido empleado fundamentalmente en programas isocráticos siendo complicado su empleo con programas de gradientes ya que se altera la línea base. Los OPA-derivados también pueden ser detectados mediante detector ultravioleta pero su sensibilidad es menor (rango de picomoles) (Ogden y Foldi, 1986).

En el presente estudio, el método de derivación elegido fué la obtención de OPA-derivados y el detector utilizado fué de fluorescencia tanto por su sensibilidad como por la posibilidad de emplear un programa de gradientes sin alterar la línea base.

La reacción del OPA (o-ftalaldehído) con los aminoácidos se realiza a un pH alcalino (9.5) y necesita un tiol como molécula auxiliar dando lugar a un producto fluorescente e inestable (Lindroth y Mopper, 1979; Allison et al., 1984; Cooper et al., 1984). Dependiendo del tiol empleado varía tanto la fluorescencia como la estabilidad de los derivados (Venema et al., 1983; Allison et al., 1984). Así, los compuestos formados con mercaptoetanol o mercaptopropiónico poseen una mayor fluorescencia y una menor estabilidad que los formados con tertbutiltiol (Allison et al., 1984; Herranz et al., 1985; Zieke, 1985; Ogden y Foldi, 1986). En la presente Tesis, la derivación se realizó con tertbutiltiol dada su mayor estabilidad, ya que la sensibilidad de este método de derivación es suficiente para las cantidades de aminoácidos presentes en perfundidos obtenidos de la corteza prefrontal (Peinado et al., 1986). No obstante, para que la inestabilidad de los derivados influyese lo menos posible

sobre la cuantificación de los aminoácidos, entre la adición del reactivo de derivación y la inyección de la muestra en el cromatógrafo se esperó un tiempo fijo de 2 minutos (modificado de Allison et al., 1984; Peinado et al., 1986; Peinado y Myers, 1988).

2.2.2.- SOBRE LA COLUMNA, LA FASE MOVIL Y EL PROGRAMA DE GRADIENTES.

Para conseguir una adecuada resolución (máxima separación y mínima dispersión) de los picos cromatográficos, se empleó una columna de fase reversa C₁₈ de 15 cm. de longitud y 5 μ de tamaño de partícula (Joseph y Davies, 1983; Cooper et al., 1984; Herranz et al., 1984, 1985). Otros autores han empleado columnas de idéntico tamaño de partícula pero de mayor longitud (Venema et al., 1983; Zielke, 1985; Girault et al., 1986; Tossman y Ungerstedt, 1986) o de menor longitud (Peinado et al., 1986). Las columnas de mayor longitud permiten mejorar la separación pero aumentan la anchura de los picos (dispersión) y enlentecen el análisis. Las columnas de menor longitud requieren un menor tiempo de análisis pero poseen una menor capacidad de separación. Por ello, se escogió una columna de longitud intermedia (15 cm) que permite una buena separación de los AA estudiados en un tiempo de 15-16 min. con un flujo de 1.2 ml/min. Para aumentar la vida media de la columna, se colocó una precolumna C₁₈ (Joseph y Davis, 1983; Venema et al., 1983).

La fase móvil consistió en una mezcla de tampón acetato sódico 50 mM (pH= 5.88) y metanol en proporciones variables dependiendo del tiempo transcurrido desde el -

inicio del análisis (programa de gradientes) (Herranz et al., 1985). Además, se le añadió un modificador orgánico (alcohol isopropílico 12.5 ml/l) para separar adecuadamente glicina y treonina (Herranz et al., 1985). El pH de la fase móvil (5.88) permite una adecuada separación y detección de los OPA-derivados de los aminoácidos (Cooper et al., 1984) y se encuentra dentro de los márgenes tolerados por la columna ($2 \leq \text{pH} \leq 8$). Dado que la derivación de las muestras requiere un pH de 9.5 (Allison et al., 1984; Cooper et al., 1984), previamente a su inyección, se le añaden 5 ul de ácido acético al 5% para evitar la pérdida de sílice por la columna (Martín del Río, comunicación personal). Tanto la derivación de las muestras como su análisis, se realizaron a temperatura ambiente (23-25°C), ya que ya que la estabilidad de los OPA-derivados de la glicina disminuye cuando aumenta la temperatura (Cooper et al., 1984). Además, temperaturas por encima de 35°C empeoran la separación por la columna (Cooper et al., 1984).

El programa de gradientes utilizado es diferente al empleado por Herranz et al. (1985) aún cuando la fase móvil utilizada es idéntica, debido a que estos autores realizan la derivación con OPA-mercaptopropiónico en lugar de OPA-tertbutiltiol. Los OPA-derivados de los aminoácidos obtenidos con tertbutiltiol son retenidos en mayor medida por la columna (eluyen con más dificultad) (Zieke, 1985). Por ello, con un programa idéntico de gradientes, los tiempos de retención son más tardíos (15-20 minutos de diferencia) y se obtiene una peor separación de los picos cromatográficos. Utilizando un flujo más alto (1.2 ml/l) y un programa de gradientes con mayor proporción de metanol, se consiguió una adecuada separación de los picos cromatográficos (ver página). Los cromat

togramas obtenidos mostraron una morfología similar a los de Peinado et al. (1986). Estos autores también emplearon tertbutiltiol como reactivo de derivación pero en condiciones isocráticas y con una fase móvil diferente (tampón fosfato sódico 0.1 M (pH= 7/metanol (60/40) (v/v)). La separación de los picos cromatográficos fué mejor en nuestro estudio debido al empleo de una columna de mayor longitud y una fase móvil consistente en tampón acetato sódico con un pH de 5.88. Además, el empleo de un programa de gradientes que incrementa la cantidad de metanol a lo largo del análisis, en lugar de un programa isocrático, disminuye el tiempo de elución y mejora la morfología de los picos evitando que los picos finales sean anchos y de excasa altura (Nieto, 1989; Nieto et al., 1989).

2.2.3.- SOBRE LA VARIABILIDAD DEL METODO.

El método de análisis de aminoácidos por HPLC acoplada a detector de fluorescencia o electroquímico, ha demostrado ser un método sensible y reproducible para el estudio de los niveles endógenos de aminoácidos (Venema et al., 1983; Cooper et al., 1984; Peinado et al., 1986). Así, Venema et al. (1983) han obtenido un coeficiente de variación menor del 1% y una sensibilidad menor de 1 pmol. Además, el método es lineal entre 1 -- pmol y 10 nmoles de aminoácidos por muestra y en volúmenes comprendidos entre 10 y 500 ul (Venema et al., 1983; Cooper et al., 1984; Peinado et al., 1986). Los niveles de aminoácidos obtenidos en las muestras de perfundido de la corteza prefrontal oscilan de 2 a 12 pmoles/ul y

el volumen inyectado de cada una de las muestras fué de 20 ul. Ambos parámetros se encuentran dentro del rango de linealidad del método.

No obstante, previamente a la realización de los experimentos, se realizó una curva de linealidad y se calcularon los coeficientes de variación para cada uno de los aminoácidos. El método fué lineal en el rango de concentraciones empleado (6.25 umolar-100 umolar) (ver gráficas 3 y 4 , pag.128 y 129). La variabilidad osciló del 1.23% obtenido para la glutamina al 4.36% obtenido para la glicina (ver tabla 5 , pag.127). Precisamente, los OPA-derivados de la glicina son menos estables que los derivados del resto de los aminoácidos estudiados (Asp, Glu, Gln, Ser) (Cooper et al., 1984). En el caso de los aminoácidos acídicos, sobre los cuales se centra fundamentalmente nuestro interés, la variabilidad fué menor (2.26% para el aspártico, 2.27% para el glutámico y 1.23% para la glutamina). Las diferencias observadas entre el coeficiente de variación obtenido por Cooper (1%) y los obtenidos en nuestro estudio, pueden ser debidos al empleo de diferentes tioles en la derivación. Mientras Cooper et al. (1984) utilizaron OPA-mercaptoetanol, nosotros empleamos OPA-tertbutiltiol-derivados que son más estables pero poseen una menor fluorescencia (Zielke, 1985; Ogden y Foldi, 1986).

2.3.- SOBRE LOS NIVELES DE AMINOACIDOS ACIDICOS EN LA
CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL.

2.3.1.- SOBRE LOS NIVELES BASALES DE AMINOACIDOS.

Los niveles observados en la literatura varían considerablemente dependiendo de las técnicas de obtención de las muestras (tejido, "push-pull" o diálisis), del protocolo experimental de las perfusiones (flujo, tiempo de duración de cada perfundido), de la localización precisa de la zona estudiada (corteza frontal, corteza frontal dorsal, corteza prefrontal medial), de las unidades de cuantificación (umoles/gr de tejido, pmoles/ul, pmoles/min., porcentaje de radioactividad) y del método de análisis empleado (cromatografía gas-líquido, cromatografía en capa fina, HPLC) (Delgado et al., 1984; Mora y Myers, 1984; Peinado et al., 1984; Mora et al., 1986; Peinado et al., 1986; Tossman et al., 1986; Peinado et al., 1987; Peinado y Myers, 1988).

Dada la complejidad existente para comparar los niveles obtenidos en tejido (que incluyen tanto el "pool" metabólico como el "pool" neurotransmisor), con los niveles obtenidos en perfundidos (Mora et al., 1986; Tossman et al., 1986), vamos a comparar nuestros datos exclusivamente con los obtenidos con las técnicas de perfusión intracerebral "push-pull" o diálisis. Igualmente, es muy difícil comparar los niveles en pmoles/ul con los porcentajes de radioactividad obtenidos tras la perfusión de precursores radioactivos y posterior análisis de los AA liberados mediante cromatografía en capa fina (Mora y Myers, 1984; Peinado et al., 1987; --

Peinado y Myers, 1988). Por ello, sólo incluiremos los perfundidos analizados mediante HPLC.

Los niveles endógenos de aminoácidos en la corteza frontal de la rata han sido poco estudiados (Peinado et al., 1986; Tossman et al., 1986). En general, los niveles de aminoácidos obtenidos en nuestro estudio son similares a los obtenidos por estos autores, excepto para la glutamina (ver tabla 16). Efectivamente, los niveles de este AA en nuestro trabajo son mucho menores (10 veces) a los obtenidos por Tossman et al., (1986). Sin embargo, son similares a los obtenidos por Peinado et al. (1986). Esto puede ser debido al diferente método de perfusión empleado en cada estudio. Así, mientras Tossman et al. (1986) utilizaron diálisis tanto en nuestro estudio como en el de Peinado et al. (1986) se empleó la técnica de perfusión "push-pull". Además, el estudio de Tossman se realizó con el animal anes-
 tesiado mientras que en los otros dos trabajos los perfundidos se obtuvieron del animal despierto y actuante.

	<u>TESIS DOCTORAL</u>	<u>PEINADO et al.</u>	<u>TOSSMAN et al.</u>
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	
ASPARTICO	3.48 \pm 0.62	1.41 \pm 0.18	0.4-0.45
GLUTAMICO	3.61 \pm 0.43	1.98 \pm 0.23	1.5-2.0
GLUTAMINA	7.92 \pm 1.31	9.01 \pm 1.54	110.0-160.0
SERINA	10.36 \pm 1.84	-----	7.2-10.82
GLICINA	11.97 \pm 1.66	6.08 \pm 0.48	4.0-6.5

Tabla 16 .- Niveles de aminoácidos en perfundidos obtenidos por diversos autores en la corteza frontal de la rata. (picomoles de aminoácidos/microlitro de perfundido).

Los niveles del resto de los aminoácidos acídicos son ligeramente superiores a los obtenidos por ambos autores. Estas diferencias pueden ser debidas a la localización precisa de las perfusiones en la corteza frontal. Así, mientras en nuestro estudio las perfusiones se realizaron en la corteza prefrontal medial, en el estudio de Peinado et al. (1986) se realizaron en la corteza frontal dorsal y en el de Tossman et al. (1986) en la corteza frontal (no se especifica el área concreta).

En cuanto a los aminoácidos no-acídicos, los niveles de Serina coinciden con los obtenidos por Tossman et al. (1986) aún cuando sus perfusiones se realizaron en un área diferente de la corteza frontal. Es interesante destacar, la similitud de los niveles obtenidos para un aminoácido con función exclusivamente metabólica. Los niveles de glicina, por su parte, son superiores a los obtenidos por Tossman et al. (1986) y Peinado et al. (1986). Estas diferencias pueden ser debidas, como anteriormente se ha sugerido para los otros dos AA - presuntamente neurotransmisores (Asp y Glu), a la diferente localización de las perfusiones en la corteza frontal.

Dado que la introducción de la cánula "push-pull" en el tejido cerebral produce edema, daño capilar, rotura celular e hipoxia local a lo largo del trayecto recorrido (Yaksh y Yamamura, 1974; Delgado et al., 1984) habría que cuestionarse si los niveles obtenidos son debidos al "pool" neurotransmisor o son la suma del "pool" neurotransmisor y el "pool" metabólico. Esta cuestión es particularmente importante para el estudio de los NT de tipo aminoácido ya que, junto a su función neurotrans

misora, poseen funciones metabólicas y estructurales -- (Matsumoto et al., 1982; Ottersen y Storm-Mathisen, --- 1984).

El grado de lesión tisular y capilar puede -- evaluarse midiendo los niveles de proteínas, de enzimas como la lactato-deshidrogenasa o de hematies en los per fundidos (Yaksh y Yamamura, 1974; Greenfield et al., -- 1983; Nieto et al., 1989). Y es en este sentido intere- sante, el hecho de que tanto los niveles de proteínas - como los de LDH se modifican escasamente durante la rea lización de una adecuada perfusión "push-pull" (Yaksh y Yamamura, 1974; Greenfield et al., 1983). Así, los nive les de proteínas son prácticamente indetectables trans- curridos 10-15 min. desde el inicio de la perfusión (- Yaksh y Yamamura, 1974). En cuanto al contenido de hema ties en los perfundidos, Nieto et al. (1989) también -- han observado un descenso progresivo a lo largo de 60 - min. de perfusión , siendo en la 4° y 5° perfusión prac ticamente indetectables. En base a estos datos, se des- cartaron las perfusiones realizadas durante los primeros 20 min. (dos perfusiones). Transcurrido este tiempo, se obtuvieron niveles basales estables de aminoácidos pre- suntamente expresión del "pool" neurotransmisor. ya que tras 20 min. no se observan signos de lesión tisular o capilar (Yaksh y Yamamura, 1974; Nieto et al., 1989). - Como puede verse en la gráfica 17, pag., 171 , los nive- les basales de los aminoácidos estudiados se mantienen constantes en dos perfundidos de la corteza prefrontal realizados consecutivamente.

2.3.2.- SOBRE LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACION ELECTRICA EN LOS NIVELES DE AMINOACIDOS ACIDICOS.

La estimulación eléctrica de la corteza prefrontal medial a intensidades comprendidas dentro del rango de autoestimulación produce un descenso significativo de los niveles de ácido glutámico. Sin embargo, la estimulación eléctrica a una intensidad umbral no modifica los niveles de aminoácidos (ver gráficas 18 , 19 y 20; páginas 173 , 175 y 177).

No existen referencias en la literatura sobre la liberación de aminoácidos neurotransmisores en la corteza prefrontal durante la estimulación eléctrica. No obstante, sí existen datos sobre estimulación eléctrica y niveles de aminoácidos en otras áreas cerebrales como el hipocampo o el estriado. Concretamente, se ha sugerido que la estimulación eléctrica del hipocampo produce un aumento de los niveles de aminoácidos "in vitro", -- particularmente de aspártico y glutámico (Szerb, 1988; Thecinga et al., 1989; Vollenweider et al., 1989). De igual forma, la estimulación eléctrica de la sustancia negra (pars reticulata) produce un aumento de la liberación "in vivo" de glutámico en estriado (Girault et al., 1986b).

El aumento de la liberación "in vitro" de aminoácidos es máximo a frecuencias de 15 Hz, disminuyendo a medida que aumenta la frecuencia de estimulación (45 Hz) (Thecinga et al., 1989). No obstante, también se produce a mayores frecuencias (Szerb, 1988; Thecinga et al., 1989). En relación a la frecuencia de estimulación y liberación de neurotransmisores "in vivo", Kurosawa et --

al. (1989) han mostrado que las frecuencias que producen un mayor aumento de la liberación de otro neurotransmisor, la acetilcolina, están comprendidas entre 20 y 100 Hz. No obstante, también en este caso, el aumento de la liberación es máximo a frecuencias de 20-50 Hz. En cuanto a las intensidades de estimulación que producen una mayor liberación "in vivo" de Ach, estuvieron comprendidas entre 0.1-0.5 mA. Precisamente, el aumento de la liberación de glutámico "in vivo" observado por Girault et al. (1986b) se obtuvo a una intensidad de 0.1 mA. Sin embargo, la frecuencia de la estimulación fué mayor (300 Hz) (Girault et al., 1986b). En nuestro estudio, el rango de intensidades empleado oscila entre 0.15-0.6 mA y la frecuencia fué de 100 Hz. Por tanto, ambos parámetros están dentro del rango empleado en los estudios "in vivo".

Sin embargo, en contraste con los datos obtenidos tanto en hipocampo como en estriado, la estimulación eléctrica de la corteza prefrontal, a una intensidad y frecuencia idénticas a la SS, produce un descenso significativo de los niveles de glutámico y de su precursor glutamina. Cuando se aumenta al doble la intensidad del estímulo, también se observa un descenso de ambos aminoácidos aún cuando el descenso de glutamina no alcanza -- significación estadística debido al menor número de datos (n=7).

El descenso de los niveles de glutamina puede ser explicado en base al aumento de su consumo con fines metabólicos (Benveniste et al., 1984; Sandberg et al., 1986; Szerb, 1988). Efectivamente, estos autores han observado una disminución de los niveles de dicho aminoácido tanto cuando aumenta la actividad neuronal (estimulación eléctrica) (Szerb, 1988) como cuando disminuye la --

llegada de glucosa al cerebro (isquemia cerebral o hipoglucemia) (Benveniste et al., 1984; Sandberg et al., 1986). El aumento de la actividad neuronal producido por la estimulación eléctrica también podría ser responsable, al menos parcialmente, del descenso de los niveles de glutámico. En este sentido, Szerb (1988) ha mostrado un descenso del contenido de glutámico en rodajas de hipocampo tras 10 min. de estimulación eléctrica ya que el aumento de las demandas energéticas produce un déficit de acetil-CoA y una insuficiente formación de α -cetoglutarato (precursor de la síntesis de glutámico) (Haslam y Krebs, 1963; Szerb, 1988). Sin embargo, en nuestro estudio se cuantificaron los niveles extracelulares de aminoácidos y no el contenido de éstos en tejido (rodajas). Cuando estos autores cuantifican los niveles de aminoácidos en el medio observan, por el contrario, un aumento de los niveles de Asp y Glu durante la estimulación eléctrica (Szerb, 1988). El descenso observado en los niveles de glutámico, por tanto, no se puede explicar en base al aumento de la actividad neuronal producido tras la estimulación eléctrica.

Un aspecto importante a destacar a la hora de comparar nuestros resultados con los obtenidos por el resto de los autores tras la estimulación eléctrica, es el diferente diseño experimental empleado. Así, todos los estudios referatados se limitan a medir los niveles de aminoácidos tras la estimulación eléctrica realizada de forma aguda. En nuestro estudio, sin embargo, el animal ha recibido el estímulo eléctrico de forma crónica durante un periodo de 15-20 días (sesiones de 15 min./ día) y ha aprendido a autoestimularse de forma constante y persistente previamente a la obtención de los perfundidos. Ello implica, sin duda, la posible existencia de --

una reorganización funcional a nivel neuronal y de interacción de neurotransmisores como consecuencia del proceso crónico del estímulo eléctrico (Mora y Cobo, 1990). -

En este sentido, el descenso de los niveles de glutámico podría ser debido al aumento de la liberación de dopamina observado durante la autoestimulación (Mora, 1978; Mora y Myers, 1977). Efectivamente, estudios neuroquímicos realizados en animales previamente testificados para SS, han mostrado que durante la estimulación eléctrica de la corteza prefrontal medial aumenta la liberación de dopamina (Mora y Myers, 1977; Mora, --- 1978). La dopamina es un neurotransmisor inhibitorio (Mora et al., 1976c; Bunney y Aghagyanian, 1976) cuya liberación a nivel cortical parece producirse en sinapsis específicas sobre las neuronas piramidales (capa V) (Seguela et al., 1988). Interesantemente, las neuronas piramidales poseen en su mayoría naturaleza glutamérgica (Parnavelas et al., 1989). Por otra parte, a nivel de la capa cortical Va existe una alta concentración de receptores glutamérgicos NMDA (Cotman et al., 1987). A la luz de estos datos, es posible que el descenso de los niveles corticales de glutámico obtenido durante la SS esté mediado por la liberación concomitante de dopamina y la consiguiente inhibición de las neuronas o terminales glutamérgicas.

Dado que el GABA ha sido localizado a nivel --cortical en neuronas intrínsecas inhibitorias (Esclapez et al., 1987), es posible que este neurotransmisor también se libere durante la estimulación eléctrica y sea responsable, junto con la dopamina, del descenso de glutámico observado. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis sería necesario cuantificar los niveles de GABA durante la autoestimulación.

Recientemente, se ha sugerido que las aferencias dopaminérgicas procedentes del área ventrotegmental y las aferencias procedentes del núcleo dorsomedial del tálamo (NDMT) sinapsan en las mismas neuronas corticales (Ferron et al., 1984). Además, el sistema mesocortical dopaminérgico inhibe el disparo espontáneo de las neuronas de la corteza prefrontal y también inhibe la excitación producida tras la estimulación del NDMT (Ferron et al., 1984). Ambos núcleos, NDMT y AVT, han sido involucrados en la SS de la corteza prefrontal medial (Phillips y Fibiger, 1978; Mora et al., 1980; Rolls et al., 1980; Morales et al., 1986). En base a estos datos, sería posible especular que, si la proyección NDMT-prefrontal fuese glutamérgica, la estimulación del sistema mesocortical durante la SS con la consiguiente liberación de dopamina podría ser la responsable del descenso de la liberación de glutámico por las terminales procedentes del NDMT. Sin embargo, esta especulación no podría asegurarse hasta que se conozca la naturaleza química de la vía NDMT-prefrontal.

En resumen, los estudios neuroquímicos junto con los estudios neurofarmacológicos, sugieren la participación de los aminoácidos acídicos, particularmente del ácido glutámico, en los substratos neuroquímicos de la SS en la corteza prefrontal medial de la rata. No obstante, sería necesario continuar estos estudios para evaluar las posibles vías glutamérgicas involucradas. El hecho de que los descensos obtenidos, tanto de la SS como de los niveles de glutámico, oscilen alrededor del 35-50% apoya la hipótesis sugerida por Mora y Ferrer (1986) que implica la interacción de varios sistemas neurotransmisores en relación a la SS de la CPM.

CONCLUSIONES

PRIMERA.-

Los estudios neurofarmacológicos realizados con DGG y D-AP5 sugieren la participación de los receptores glutamérgicos NMDA en los sustratos neuroquímicos de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata.

SEGUNDA.-

Los resultados obtenidos tras la microinyección intraventricular e intracortical de Glau-tau sugieren que los receptores kainato y quisqualato no están involucrados en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial.

TERCERA.-

La estimulación eléctrica de la corteza prefrontal medial a intensidades comprendidas dentro del rango de autoestimulación produce un descenso significativo de los niveles de ácido glutámico.

CUARTA.-

Los estudios neurofarmacológicos junto con los estudios neuroquímicos, sugieren la participación de los aminoácidos acídicos, particularmente del ácido glutámico y de los receptores NMDA, en los sustratos neuroquímicos de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata.

BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Ghani A, Couthinho-Netto J y Bradford HF. (1981). In vivo --
superfusion methods and release of glutamate. En: Glutamate:
Transmitter in the Central nervous system. PJ Roberts, GAR --
Johnston and J Storm-Mathisen (Eds.) Johs Wiley, New York ---
pp 155-203.
- Adams RN y Marsden CA. (1982). Electrochemical detection methods
for monoamine measurements in vitro and in vivo. En: Handbook
of Psycho-pharmacology. LL Iversen y Snyder SH (Eds.). Plenum
Press. New York.
- Allison LA y Shoup RE (1984). O-Pthalaldehyde derivatives of ami--
nes for high speed liquid chromatography electrochemistry. --
Anal. Chem., 56: 1089-1069.
- Altar A, Neve KA, Loughlin SE, Marshall JF y Fallon JH. (1983). --
The crossed mesostriatal projection: neurochemistry and deve-
lopmental response to lesion. Brain Research, 279: 1-8.
- Ascher P y Nowak L. (1987). Electrophysiological studies of NMDA -
receptors. TINS, 10: 284-288.
- Backus LI, Stellar JR, Jacob J, Hesse GW y Shashova VE. (1988). --
Novel GABA agonists depresses the reward effect of lateral --
hypothalamic stimulation in rats. Pharmacol. Biochem. Behav.,
30: 657-63.
- Balazs M, Schwarzberg H, Penke B y Telegdy G. (1988). Effects of -
cholecystokin-related peptides on SS Behaviour in rats. ----
Neuropeptides, 11: 143-145.
- Ball GC, Micco DJ Jr. y Berntson GG. (1974). Cerebellar stimula---
tion in the rat: complex stimulation-bound oral behaviors and
self-stimulation. Physiol. Behav., 13: 123-127.

- Bard AG y Faulkner LR. (1980). Electrochemical Methods, p. 153. -- Wiley y Sons. New York.
- Baumgarten HG, Bjorklund A, Horn AS y Schlossberger HG. (1974). -- Studies on the neurotoxic properties of hydroxylated tryptamines. En: Dynamics of Degenerations and Growth in Neurons. K - Fuxe, L Olsen, Y Zotterman (Eds.), Pergamon, Oxford: 153-167.
- Beckstead RM. (1979). An autoradiographic examination of the corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal - - projection (prefrontal) cortex in the rat. J. Comp. Neurol., 184: 43-62.
- Belluzzi JD y Stein L. (1977). Enkephalins may mediate euphoria -- and drive reduction reward. Nature, 266: 556-557.
- Bendani T y Cazala P. (1988). Differential effects of intracerebral microinjection of morphine on approach and escape responses induced by lateral hypothalamic stimulation in the mouse. Pharmacol. Biochem. Behav., 30: 397-401.
- Benveniste H. (1989). Brain Microdialysis. J. Neurochem., 52: ---- 1667-1679.
- Benveniste H y Diemer NH. (1987). Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. Acta --- Neuropathol. (Berl.), 74: 234-238.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A y Diemer NH. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J. Neurochem., 43: 1369-1374.

- Benveniste H, Hansen AJ y Niels Saabye Ottosen (1989). Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. - J. Neurochem., 52: 1741-1750.
- Berger B, Tassin JP, Blanc G, Moyne V y Thierry AM. (1974). Histochemical confirmation for dopaminergic innervation of the rat cerebral cortex after destruction of the noradrenergic ascending pathways. Brains Res., 81: 332-337.
- Berger B, Thierry AM, Tassin JP y Moyne MA (1976). Dopaminergic innervation of the rat prefrontal cortex: a fluorescence histochemical study. Brain Res., 106: 133-145.
- Bermudez-Rattoni F, Cruz-Morales S y Reid LD. (1983). Addictive agents and intracranial stimulation (ICS): Novel antagonists of agonists of morphine and pressing for ICS. Pharmacol. Biochem. Behav., 18: 777-784.
- Besson MJ, Kemel ML, Ganchy C, Girault JA, Spampinato V, Lantin N, Desban M y Glowinski J. (1986). In vivo measurement of 3-H-GABA. Release: An approach to the study of the regulation associated structures in the cat and the rat. En: Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltammetry and push-pull perfusion. (Ed.) RD Myers y PJ Knott. Annals of the New York Academy of Science., 473: 475-488.
- Bielajew C y Shizgal P. (1982) Behaviorally derived measured of conduction velocity for rewarding medial prebrain bundle stimulation. Brain Res., 237: 107-119.
- Bielajew C y Shizgal P. (1986) Evidence implicating descending fibers in self-stimulation of the medial prebrain bundle. J. Neurosci., 6: 919-929.

- Bielajew C, Lapointe M, Kiss I y Shizgal P. (1982). Absolute and relative refractory periods of the substrates for lateral -- hypothalamic and ventral midbrain self-stimulation. Physiol. Behav., 28: 125-132.
- Bito L, Davson H, Levin E, Murray M y Snider N. (1966). The concentration of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain and blood plasma of the dop. J. Neurochem., 13: 1057-1067.
- Blan B. (1981). Amino acids analysis by gas chromatography. En: -- Amino acid analysis. (Eds.) JM Rattenbury. E. Horwood Ltd. J. Wiley and sons. Chichester.
- Bouboutou R, Waksman G, Devin J, Fournie-Zaluski MC y Roques BP. (1984). Bidentate peptides: highly potent new inhibitors of enkephalin degrading enzymes. Life Sci., 35: 1023-1030.
- Boyd ES y Gardner LC. (1962). Positive and negative reinforcement from intracranial self-stimulation in teleost. Science, 136: 648.
- Boyd ES y Gardner LC. (1967). Effect of some brain lesions on -- intracranial self-stimulation in the rat. Am. J. Physiol., - 213: 1044-1052.
- Bozart MA y Wise RA. (1981). Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. Life Sci., 28: 551-555.
- Bradford HF, Abdul-Ghani AS, Continho-Netto J, Thanki OM y Peterson DW. (1986). Transmitter release from cerebral cortex and olfactory bulb in vivo monitored by chronic superfusion in -- freely moving animals. En: Monitoring neurotransmitter. ---- MacDonal and CA Marsden (Eds.) Ellis Horwood Ltd. Chichester.

- Brady JV. (1960). Temporal and emotional effects related to intracranial electrical self-stimulation. En: Electrical Studies on the Unanesthetized Brain. E Ramsey, D O'Doherty (eds.), -- New York, Hoeber: 52-57.
- Brady JV y Conrad DG. (1960). Some effects of limbic system self-stimulation upon conditioned emotional behaviour. J. Comp. -- Physiol. Psychol., 53: 128-137.
- Breese GR Cooper Br. (1975). Relationship of dopamine neural systems to the maintenance of self-stimulation. En: Neurotransmitters and Behaviour. C. Domino, J Davis (Eds.), Edward Bros, Ann Arbor Mich: 37-56.
- Broekkamp CL, Phillips AG y Colls AR. (1979). Facilitation of self-stimulation behavior Following intracerebral microinjections of opioids into the ventral tegmental area. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 11: 289-295.
- Brownstein MJ, Mroz EA, Kizer JS, Palkovits M y Leeman SA. (1976). Regional distintation of substance P in the brain of the rat. Brain Res., 116: 299-385.
- Bruner A. (1966) Facilitation of classical conditioning in rabbits by reinforcing brain stimulation. Psychon. Sci., 6: 211-212.
- Bunney BS. (1987). Central dopamine-peptide interactions: electrophysiological studies. Neuropharmacology, 26: 1003-1009.
- Bunney BS y Aghajanian GK. (1976). Dopamine and norepine phrine -- innervated cells in the rat prefrontal cortex: pharmacological differentiation using microiontophoretic techniques. Life Sci., 19: 1783-1792.

- Bunney BS y Grace AA. (1978). Acute and chronic haloperidol treatment comparison of effects on nigral dopaminergic cell activity. Life Sci., 23: 1715-1728.
- Bush HD, Bush MF, Miller MA y Reid LD. (1976). Addictive agents - intracranial self-stimulation: Daily morphine and lateral hypothalamic self-stimulation. Physiol-Phychol., 4: 79-85.
- Candy J, Perry E, Biggins A, Thompson J e Irving D. (1983). En: - Agins of the Brain, WH Gisper y J Traver (Eds.) Elsevier Sci. Publishers, pp, 29-48.
- Carey RJ. (1982). Unilateral 6-hidroxi-dopamine lesions of dopamine neurons produce bilateral self-stimulation deficits. Behav. Brain Res., 6: 101-114.
- Carr KD y Bak TH. (1988). Medial thalamic injection of opioid agonist: mu-agonist increases while Kappa-agonist decreases stimulus thresholds for pain and reward. Brain Res., 441: 173-184.
- Cazala P. (1986). Self-stimulation behaviour can be elicited from various "aversive" brain structures. Behav. Brain. Res., 22: 163-171.
- Cazala P, y Zielinski A. (1983). A Y-maze test reveals the positively reinforcing properties of electrical stimulation of the mesencephalic central gray area. Brain Res., 273: 143-146.
- Cazala P, Bendani T y Zielinski A. (1985). Self-stimulation of an "aversive" brain structure: the mesencephalic central gray -- area. Brain Res., 327: 53-60.
- Cheramy A, Michelot R, Leviel V, Nieaillon A, Glowinski I y Kerdelhue B. (1978). Effects of the immunoneutralization of substance P in the cat, substantia nigra on the release of dopamine from dendrite and terminals of dopaminergic neurons. Brain Res., 155: 404-408.

- Cheramy A, Romo R, y Glowinski J, (1986). The relative roles of neuronal activity and direct presynaptic mechanisms in controlling the release of dopamine from the cat caudate nucleus. En: Neurochemical analysis of the Concious Brain: Voltammetry and push-pull perfusion. RD Myers y pj Knott (Eds). Annals of the New York Academy of Science, 473: 80-87.
- Childs JA y Gale K, (1983). Neurochemical evidence for a nigrotegmenal GABAergic projection. Brain Res., 258: 109-114.
- Clavier RM, (1979). Afferent projections to the self-stimulation regions of the dorsal pons, including the locus coeruleus, in the rat as demonstrated by the horseadish peroxidase technique. Brain Res., 4: 497-504.
- Clavier RM y Fibiger HC, (1977). On the role of ascending catecholaminergic projections in intracranial self-stimulation of the substantia nigra. Brain Res., 131: 271-286.
- Clavier RM y Gerfen CR, (1982). Intracranial self-stimulation in the thalamus of the rat. Brain Res. Bull., 8: 353-358.
- Clavier RM y Routtenberg A, (1975). Brain stem self-stimulation attenuated by lesions of medial forebrain bundle but not by lesion of locus coeruleus or caudal ventral norepinephrine bundle. Brain Res., 101: 251-271.
- Clavier RM, Fibiger HC y Phillips AG, (1976). Evidence that self-stimulation of the region of the locus coeruleus in rats does not depend upon noradrenergic projections to telencephalon. Brain Res., 113: 71-81.
- Cobo M, Ferrer JMR y Mora F, (1989). The role of the lateral cortico-cortical prefrontal pathway in self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat. Behav. Brain Res., 31: 257-265.

- Cohen RM, Semple WE, Gross M, y Nordahl TE. (1988). From syndrome to illness: delineating the pathophysiology of schizophrenia with P.E.T. Schizophr. Bull., 14: 169-76.
- Colle LM, y Wise RA. (1987). Opposite effects of unilateral pre---brain ablations on ipsilateral and contralateral hypothalamic self-stimulation. Brain Res., 407: 285-293.
- Collier TJ, y Routenberg A. (1984). Electrical self-stimulation of dentate gyrus granule cells. Behav. Neurol. Biol., 42: 85-90.
- Collier VT, Kurtman S, y Routenberg A. (1977). Intracranial self-stimulation derived from entorhinal cortex. Brain Res., 137: 188-196.
- Cooper RM, y Taylor LH. (1967). Thalamic reticular system and central gray: self-stimulation. Science, 156: 102-103.
- Cooper BR, Cott JM, y Breese GR. (1974). Effects of catecholamine-depleting drugs and amphetamine on self-stimulation of brain following various 6-hydroxidopamine treatments. Psychopharmacologia, 37: 235-48.
- Cooper BR, Konkol RJ, y Breese GR. (1978). Effects of catecholamine-depleting drugs and d-amphetamine on self-stimulation of the substantia nigra and locus coeruleus. J. Pharmacol. Exp. Ther., 204: 592-605
- Cooper JDH, Ogden G, McIntosh J, y Turnell DC. (1984). The stability of the O-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatives of --amino acids: An investigation using high-pressure liquid ----chromatography with a precolum derivatization-technique. Analytical Biochem., 142: 98-102.
- Copeland RL, Jr. y Pradhan SN. (1988). Effect of morphine on self-stimulation in rats and its modification by chloramphenicol. Pharmacol. Biochem. Behav., 31: 933-935.

- Corbett D y Wise RA. (1980). Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: A moveable electrode mapping study. Brain Res., 185: 1-15.
- Corbett D, Skelton RW y Wise RA. (1977). Dorsal bundle lesions fail to disrupt self-stimulation from the region of locus coeruleus. Brain Res., 133: 37-44.
- Corbett D, Laferrière A y Milner PM. (1982a). Elimination of medial prefrontal cortex self-stimulation following transection of efferents to the sulcal cortex in the rat. Physiology and Behavior, 29: 425-431.
- Corbett D, Silva LR y Stellar JR. (1982b). An investigation of the factors affecting development of frontal cortex self-stimulation. Physiology and Behavior, 34: 89-95.
- Cotman CW e Iversen LL. (1987). Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. TINS, 7: 263-265.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP y Storm-Mathisen J. (1987). Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. TINS, 10: 273-280.
- Coyle JT. (1982). Neurotoxic amino acids in human degenerative disorders. TINS, 5: 287-288.
- Crawley JN, Stivers JA, Blumstein LK y Paul SM. (1985). Cholecystinin potentiates dopamine-mediated behaviours: evidence for a modulation specific to a site of coexistence. J. Neurosci., 5: 1972-1983.
- Croucher MJ, Collins JF y Meldrum BS. (1982). Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. Science, 216: 899-901.
- Crow TJ. (1972). A map of the rat mesencephalon for electrical self-stimulation. Brain Res., 36: 265-273.

- Cuello AC. (1983). Central distribution of opioid peptides. Br. - Med. Bull., 39: 11-16.
- Cuello A y Kanazawa I. (1978). The distribution of substance P -- immunoreactive fibers in the rat central nervous system. --- J. Comp. Neurol., 178: 129-156.
- Cuello AC y Sofroniew. (1984). The anatomy of the CNS cholinergic neurons. TINS, 7: 74-78.
- Dahlstrom A y Fuxe K. (1964). Evidence for the existence of monoamine containing neurones in the central nervous system. I: -- demonstration of monoamine neurones in the cell bodies of --- brain stem neurones. Acta Physiol. Scand., 62 (supl.232): -- 1-80.
- Dalsass M, Kiser S, Mendershausen M y German DC. (1981). Medial - prefrontal cortical projections to the region of the dorsal periventricular catecholamine system. Neuroscience, 6: 657-665.
- Davies J, Evans RH, Francis AA, Jones AW y Watkins JC. (1981). -- Antagonism of excitatory amino acid induced synaptic excitation of spinal neurons by cis-2,3-piperidinedicarboxylate. - J. Neurochem., 36: 1305-1307.
- Davison AN. (1981). Biochemistry of the nervous system. En: The - molecular basis of neuropathology. Eds: A.N. Davison y R.H.S Thompson. pp 1-13. Edward Arnold. London.
- De Feudis FV, Delgado JMR y Roth RH. (1970). Content, synthesis - and collectability of amino acids in various structures of - the brain of rhesus monkeys. Brain Res., 18: 15-23.
- Delgado JMR, De Feudis FV, Roth RH, Ryugo DK y Mitruka BK. (1972) Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake -- monkeys. Arch. Int. Pharmacodyn., 198: 9-21.

- Delgado JMR, Lerma J, Martin del Rio R y Solis JM. (1984). Dialy-
trode technology and local profiles of amino acids in the ---
awake cat brain. J. Neurochem., 42: 1218-1228.
- Deniau JM, Thierry AM y Feger J. (1980). Electrophysiological ---
identification of mesencephalic ventro tegmental (VMT) neurons
projecting to the frontal cortex, septum and nucleus accum---
bens. Brain Res., 189: 315-326.
- De Quidt ME y Emson PC. (1986). Distribution of neuropeptide Y-
like immunoreactivity in the rat central nervous system-II. -
Immunocytochemical analysis. Neuroscience, 18: 545-618.
- Deutsch JA. (1964). Behavioral measurements of the neural refracto
ry period and its application to intracranial self-stimula---
tion. J. Comp.Physiol.Psychol., 58: 1-9.
- De Witte P, Heidbreder C y Roques BP. (1989). Kelatorphan, a po--
tent enkephalinases inhibitor, and opioid receptor agonists
DAGO and DTLET, differentially modulate self-stimulation beha
viour depending on the site of administration. Neuropharmaco-
logy, 28: 667-676.
- Dinopoulos A, Dori I, Davies SW y Parnavelas JG. (1989). Neuroche
mical heterogeneity among cortifugal and callosal projections
Exp. Neurol., 105: 36-44.
- Divac I, Kosmal A, Bjorklund A y Lindvall O. (1978).Subcortical
projection to the prefrontal cortex in the rat as revealed by
the horseradish peroxidase technique. Neuroscience, 3: 785-
796.
- Docherty M, Bradford HF y Wu JY. (1987). Co-release of glutamate -
and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. --
Nature, 330: 64-66.
- Dockray GF. (1980). Cholecystokinin in rat cerebral cortex: identi
fication, purification and characterization by immunochemical
methods. Brain Res., 118: 155-165.

- Dodd PR y Bradford HF. (1974). Release of amino acids from the chronically-superfused mammalian cerebral cortex. J. Neurochem., 23: 289-292.
- Domino EF y Olds ME. (1986). Cholinergic inhibition of self-stimulation behaviour. J. Pharmac. Exp. Ther., 164: 202-221.
- Dori I, Petrov M y Parnavelas JG. (1989). Excitatory transmitter amino acid-containing neurons in the rat visual cortex: a light and electron microscopic immunocytochemical study. J. Comp. Neurol. (in press).
- Doucet G, Descarries L, Audet MA, Garcia S y Berger B. (1988). Radioautographic method for quantifying regional monoamine innervations in the rat brain. Application to the cerebral cortex. Brain Res., 441: 233-259.
- Druhan JP, Fibiger HC y Phillips AG. (1989). Differential effects of cholinergic drugs on discriminative cues and self-stimulation produced by electrical stimulation of the ventral tegmental area. Psychopharmacology, 97: 331-338.
- Einarsson S. (1985). Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenyl-methylchloroformate and reverse phase in high performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 348: 213-229.
- Eison AE, Eison MS e Iversen SD. (1982). The behavioural effects of a novel substance P analogue following infusion into the ventral tegmental area or substantia nigra of rat brain. Brain Res., 238: 137-152.
- Elliot PJ, Alpert JE, Bannon MJ e Iversen SD. (1986). Selective activation of mesolimbic and mesocortical dopamine metabolism in rat brain by infusion of a stable substance P analogue into the ventral tegmental area. Brain Res., 363: 145-147.

- Emson PC. (1978). Complementary distribution of dopamine, substance P and acetylcholine in the rat prefrontal cortex and septum. - En: Advances in Biochemical Psychopharmacology. PJ Roberts --- (ed.), Raven Press, New York, vol. 19: 397-400.
- Emson PC, y Lindvall O. (1979). Distribution of putative neurotransmitters in the neocortex. Neuroscience, 4: 1-30.
- Emson PC, Gilbert RFT, Loren I, Fahenkrug J, Sundler F, y Schaffa--litzky de Muckadell OB. (1979). Development of vasoactive intestinal polipeptide (VIP) containing neurones in the rat --- brain. Brain Res., 117: 437-444.
- Epstein AN, Fitzsimons JT, Rolls BJ. (1970). Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. J. Physiol., -- 210: 457-474.
- Esclapez M, Campistron G, y Trottier S. (1987). Immunocytochemical localization and morphology of GABA-containing neurons in the prefrontal and frontoparietal cortex of the rat. Neuroscience Lett., 77: 131-136.
- Espósito R, y Kornetsky C. (1977). Morphine lowering of self-stimulation thresholds; lack of tolerance with long-term administration. Science, 195: 189-191.
- Espósito RV, y Kornetsky C. (1978). Opioid and rewarding brain --- stimulation. Neurosci. Biobehav. Rev., 2: 115-122.
- Espósito RV, Perry W, y Kornetsky C. (1980). D-amphetamine and naloxone on brain stimulation reward. Psychopharmacology, 69: - 187-191.
- Espósito RV, Perry W, y Kornetsky C. (1981) Chlorpromazine and -- brain stimulation reward: potentiation of effects by naloxone. Pharmacol. Biochem. Behav., 15: 903-905
- Ettenberg A, y Duvauchelle CL. (1988). Haloperidol blocks the conditioned place preferences induced by rewarding brain stimulation. Behav. Neurosci., 102: 687-91.

- Fagg GE. (1985). L-glutamate, excitatory amino acid receptors and brain function. Trends in Neurosciences, 8 : 207-210.
- Fagg GE, y Foster AC. (1983). Amino acid neurotransmitters and -- their pathways in the mammalian central nervous system. Neuroscience, 9: 701-719.
- Fagg GE, y Lane JD. (1979). The uptake and release of putative -- amino acid neurotransmitters. Neuroscience, 4: 1015-1036.
- Fantie BD, y Nakajima S. (1987). Operant conditioning of hippocam pol theta: dissociating reward from performance deficits. -- Behav. Neurosci., 101: 626-633.
- Fekete M, Lengyrl A, Hegedus B, Rentzsch A, Schwarberg H, y Teleg dy G. (1983). Effects of cholecystokinin octapeptides on --- avoidance and self-stimulation behaviour or rats. Neurosc. - Letters, supl. 14: 113.
- Fekete M, Szipoes I, Malmai L, Franczia P, Kardos A, Csonka E, - Szantfo-Fekete M, y Telegdy G. (1987). Cholecystokinin and -- the central neurons system. En: Neuropeptides and brain. --- Function (ed.) Telegdy G., Karger, Basel, pp. 175-251.
- Ferraro TN, y Hare TA. (1984). Triple-column ion-exchange physio- logical amino acid analysis with fluorescent detection: Base line characterization of human cerebrospinal fluid. Analyti- cal Biochem., 143: 82-94
- Ferrer JMR. (1984) Bases neurales de la autoestimulacion en la -- corteza prefrontal de la rata. Tesis Doctoral, Facultad de - Medicina, Universidad de Granada.
- Ferrer JMR, Sanguinetti AM, Vives F, y Mora F. (1983). Effects of agonists and antagonists of D1 and D2 dopamine receptors on self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 19: 211-217.

- Ferrer JMR, Myers RD y Mora F, (1985). Supression of self-stimulation of the medial prefrontal cortex after local micro-injection of kainic acid in the rat. Brain Res. Bull., 15: 225-228.
- Ferrer JMR, Cobo M y Mora F. (1987). The basolateral limbic circuit and self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat. Physiology and Behaviour, 40: 291-295.
- Ferrer JMR, Cobo M y Mora F, (1988). Peptides and self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat: Effects of intracerebral microinjections of substance P and cholecystokinin. Peptides, 9: 1-7.
- Ferron A, Thierry AM, Ledonarin C y Glowinski J. (1984). Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic system on spontaneous activity or excitatory response induced from the thalamic mediodorsal nucleus in the rat prefrontal cortex. Brain Res., 302: 257-265.
- Fibiger HC. (1978). Drugs and reinforcement mechanism. A critical review of the catecholamine theory. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 18: 37-56.
- Fink RP y Heimer L. (1967). Two methods for selective silver impregnation of degenerated axons and their synaptic ending - in the central nervous system. Brain Res., 4: 369-374.
- Fonnum F. (1984). Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. J. Neurochem., 42: 1-11.
- Fonnum F, Soreide A, Kvala I, Walker J y Walaas I. (1981a). Glutamate in cortical fibers. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 27: 29-42.
- Fonnum F, Storm-Mathisen J y Divac I. (1981b). Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibers in rat brain. Neuroscience, 6: 863-873.

- Foster AC y Fagg GE. (1984). Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. Brain Res. Rev., 7: 103-164.
- Foster GA y Schultzberg M. (1984). Immunocytochemical analysis of the ontogeny of neuropeptide Y immunoreactive neurons in foetal rat brain. Int. J. Devl. Neurosci., 2: 387-407.
- Fouriezos G y Wise RA. (1976). Pimozide-induced extinction of - intracranial self-stimulation. Response patterns rule out - motor or performance deficits. Brain Res., 103: 377-380.
- Fouriezos G, Hansson P y Wise R. (1978). Neuroleptic induced -- attenuation of brain stimulation reward in the rat. J. Comp. Physiol. Psychol., 92: 661-671.
- Fouriezos G, Walker S, Rick J y Bielajew C. (1987). Refractoriness of neurons mediating intracranial self-stimulation in the anterior basal forebrain. Behav. Brain Res., 24: 73-80.
- Frandsen A, Orejer J y Schousboe A. (1989). Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) as well as non-NMDA receptors. J. Neurochem., 53: 297-299.
- Franklin KBJ. (1978). Catecholamines and self-stimulation: Reward and performance effects dissociated. Pharmacol. Biochem. Behav., 9: 813-820.
- Franklin KBJ y Robertson A. (1982). Effects and interactions of naloxone and amphetamina on self-stimulation of the prefrontal cortex and dorsal tegmentum. Pharmacol. Biochem. Behav., 16: 433-436.
- Fray PJ, Dunnett SB, Iversen SD, Björklund A y Stenevi U. (1983). Nigral transplants reinnervating the dopamine-depleted neostriatum can sustain intracranial self-stimulation. Science, 219: 416-419.

- Freedman NL y Pangborn D, (1984). Site-specific naloxone blockade of brain self-stimulation duration. Pharmacol. Biochem. Behav., 20: 361-6.
- Fukamachi F y Takahashi R, (1988). Regional effects of apomorphine on rat brain cholecystinin-8 like immunoreactivity following electrolytic lesions of the ventral tegmental area. Neuropeptides, 11: 63-67.
- Fuster JM, (1980). The prefrontal cortex. Anatomy, physiology and neuropharmacology of the prefrontal lobe. Raven Press, New York.
- Fuxe K y Jonsson G, (1974). Further mapping of central 5-hydroxytryptamine neurons: studies with the neurotoxic dihydroxytryptamines. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 10: 1-12.
- Fuxe K, Goldstein M, Hokfelt T, Jonhson G y Lidbrink P, (1974). Dopaminergic involvement in hypothalamic function: extralaminic and hypothalamic control. A neuroanatomical analysis. Advanc. Neurol., 5: 405-419.
- Gaddum JH, (1961). Push-pull cannulae. J. Physiol., 155: 1-2.
- Gallistel CR, (1986). The role of the dopaminergic projections in MFB self-stimulation. Behav. Brain Res., 22: 97-105.
- Gallistel CM y Doris J, (1983). Affinity for the dopamine D₂-receptor predicts hemoleptic potency in blocking the reinforcing effect of MFB stimulation. Pharmacol. Biochem. Behav., 19: 867-872.
- Gallistel CR y Freyd G, (1987). Quantitative determination of the effects of catecholaminergic agonists and antagonists on the rewarding efficacy of brain stimulation. Pharmacol. Biochem. Behav., 26: 731-741.
- Gallistel CR y Karras D, (1984). Pimozide and amphetamine have opposing effects on the reward summation function. Pharmacol. Biochem. Behav., 20: 73-77.

- Gallistel CR, Rolls ET y Greene D, (1969). Neuron function inferred from behavioural and electrophysiological estimates of refractory period. Science, 166: 1028-1030.
- Gallistel CR, Shizgal P y Yeomans JS, (1981). A portrait of the substrate for self-stimulation. Psychol. Rev., 88: 228-273.
- Gallistel CR, Boytin M, Gomita Y y Klebanoff L, (1982). Does pimozide block the reinforcing effect of brain stimulation? Pharmacol. Biochem. Behav., 17: 769-781.
- Gallistel CR, Gomita Y, Yadin E y Campbell KA, (1985). Forebrain origins and terminations of the medial forebrain bundle metabolically activated by rewarding stimulation or by reward-blocking doses of pimozide. J. Neurosci., 5: 1246-1261.
- Gerfen ChR y Clavier RM, (1981). Intracranial self-stimulation from the sulcal prefrontal cortex in the rats: the effect of 6-hydroxydopamine or kainic acid lesions at the site of stimulation. Brain Res., 224: 291-304.
- German DC y Bowden DM, (1974). Catecholamine systems as the neural substrate for intracranial self-stimulation: a hypothesis. Brain Res., 73: 381-419.
- German DC, Dolssas M y Kiser R, (1980). Electrophysiological examination of the ventral tegmental (A10) area in the rat. Brain Res., 181: 191-197.
- Girault JA, Barbeito L, Spampinato V, Gozlan H, Glowinski J y Besson MJ, (1986a). In vivo release of endogenous amino acids from the rat striatum: further evidence for a role of glutamate and aspartate in corticostriatal neurotransmission. J. Neurochem., 47: 98-106.
- Girault JA, Spampinato V, Desban M, Glowinski J y Besson MJ, (1986b). Enhancement of glutamate release in the rat striatum following electrical stimulation of the nigrothalamic pathway. Brain Res., 374: 362-6.

- Goldstein JM y Malick JB, (1977). Effect of substance P on medial fore-brain bundle self-stimulation in rats following intracerebral administration. Pharmacol. Biochem. Behav., 7: 475-78.
- Goodall EB y Carey RJ, (1975). Effects of d-versus l-amphetamine, food deprivation and current intensity on self-stimulation of the lateral hypothalamus, substantia nigra and medial prefrontal cortex of the rat. J. Comp. Physiol. Psychol., 89: 1029-1045.
- Goodall EB, Vale HE, Carey RJ y Lorens SA, (1976). Differential effects of morphine and amphetamine on medial frontal and lateral hypothalamic self-stimulation. En: Brain stimulation reward. (Eds.) Wauquier A y Rolls. North Holland Pub. Co., Amsterdam, pp. 196-198.
- Goodman IJ y Brown JL, (1966). Stimulation of positively and negatively reinforcing sites in the avian brain. Life Sci., 5: 693-704.
- Govoni S, Yang HYT, Bosio A, Pasinetti G y Costa E, (1982). Possible interactions between cholecystokinin and dopamine. En: Advances in Biochemical Psychopharmacology, 33. (Eds.) Costa E y Trabucchi. Raven Press, New York, pp. 437.
- Graham RC y Karnowsky MJ, (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem., 14: 291-302.
- Greenfield SA, Cheramy A y Glowinsky J, (1983). Evoked release of proteins from central nervous in vivo. J. Neurochem., 40: 1048-1057.
- Hall RD, Bloom FE y Olds J, (1977). Neuronal and neurochemical substrates of reinforcement. Neurosci. Res. Prog. Bull., 15: 141-314.

- Hamberger A, Berthold CH, Karlsson B, Lehmann A y Nyström B, (1983). Extracellular GABA, glutamate and glutamine in vivo perfusion dialysis of the rabbit hippocampus. En: Glutamine, glutamate and GABA in the Central Nervous System. (Eds.) Hertz L, Kvarnemo E, McGeer EG y Schovsboe A, pp. 473-492. Alan R Liss, New York.
- Hand TH y Franklin KBJ, (1983). The influence of amphetamine on preference for lateral hypothalamic versus prefrontal or ventral tegmental area self-stimulation. Pharmacol. Biochem. Behav., 18: 695-699.
- Hattori T y McGeer EG, (1977). Fine structural changes in the rat striatum after local injections of kainic acid. Brain Res., 129: 174-180.
- Headcote JC y Davies DH, (1971). Improved technique for the analysis of amino acids and related components on thin layer cellulose. IV. Quantitative determination of amino acid in urine. J. Chromatogr., 55: 377-381.
- Heidbreder C, Roques B, Vanderhaeghen JJ y Witte PH. (1988). Ketorphan, a potent enkephalinases inhibitor, presents opposite properties when injected intracerebroventricularly or into the nucleus accumbens on intracranial self-stimulation. Neurochem. Int., 12: 247-350.
- Heidbreder C, Roques BP y De Witte P. (1989). Similar potencies of CCK-8 and its analogue BOC (Nle28; Nle31) CCK27-33 on the self-stimulation behaviour both are antagonized by a newly synthesized cyclic CCK analogue. Neuropeptides, 13: 89-94.
- Heinrikson RL y Meredith SC. (1983). Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. Anal. Biochem., 136: 65-74.

- Herranz AS, Ierma J y Martín del Río R. (1984). Determination of γ -aminobutyric acid in physiological samples by simple, rapid high-performance liquid chromatographic method. J. Chromatography, 309: 139-144.
- Herranz AS, Cristín JLR, Ierma J y Martín del Río R. (1985). Incremento de sensibilidad en los análisis por CLAE de los OPA-aminoácidos usando como reactivo de derivación el ácido 3-mercaptopropiónico. Resúmenes de la Reunión Científica Anual del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines. R.S.E.Q. Sevilla. pp 58-59.
- Hery F, Faudon M y Fueri C. (1986). Release of serotonin in structures containing serotonergic nerve cell bodies: Dorsalis raphe nucleus and nodose ganglia of the cat. En: Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltammetry and push-pull perfusion. (Eds.) R.D. Myers and P.J. Knott. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 473, pp 239-255.
- Hodos W. (1965). Motivational properties of long duration of rewarding brain stimulation. J. Comp. Physiol. Psychol., 59: 219-224.
- Hökfelt T, Rehfeld JF, Skirboll L, Ivemark B, Goldstein M y Markey K. (1980). Evidence for coexistence of dopamine and CCK in mesolimbic neurons. Nature, 285: 476-478.
- Holloway JA. (1975). Norepinephrine and serotonin: specificity of release with rewarding electrical stimulation of the brain. - Psychopharmacología, 42: 127-134.
- Holtzman SG. (1976). Comparison of the effects of morphine, pentazocine, cyclazocine and amphetamine on intracranial self-stimulation in the rat. Psychopharmacología, 46: 223-227.
- Honoré T, Davies SN, Drejer J, Fletcher FJ, Jacobsen P, Lodge D y Nielsen FF. (1988). Quinoxalinediones potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. Science, 241: 701-703.

- Hopkins DA. (1976). Hypothalamic and brainstem connections of -- self-stimulation pathways studied using the retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the rat. -- En: Brain Stimulation Reward. (Eds.) A. Wauquier y E.T. -- Rolls, North Holland, Amsterdam, pp 53-56.
- Huang YH y Routenberg A. (1971). Lateral hypothalamic self-stimulation pathways in *rattus norvegicus*. Physiol. Behav., 7: 419-432.
- Hubner CB y Kornetsky C. (1984). The effects of heroin on brain-stimulation reward. Soc. Neurosci. Abstr., 10: 1106.
- Hunt GE, Atrens DM, Becker FT y Paxinos G. (1978). Alpha-adrenergic modulation of hypothalamic self-stimulation: effects of phenoxibenzamine, yohimbine, dexamphetamine and their interactions with clonidine. Eur. J. Pharmacol., 53: 1-8.
- Husek P. (1982). Gas chromatography of cyclic amino acid derivatives. A useful alternative to esterification procedures. J. Chromatogr., 234: 381-393.
- Husek P y Macek K. (1975). Gas chromatography of amino acids. J. Chromatogr., 113: 139-230.
- Huston JP y Boberly A. (1973). Operant conditioning in forebrain ablated rats by use of rewarding hypothalamic stimulation. -- Brain Res., 50: 467-472.
- Huston JP, Kiefer S, Buscher W y Muñoz C. (1987). Lateralized -- functional relationship between the preoptic area and lateral hypothalamic reinforcement. Brain Res., 436: 1-8.
- Hyttel J. (1983). SCH 23390- The first selective dopamine D₁ antagonist. Eur. J. Pharmacol., 91: 153-154.
- Ichitani Y e Iwasaki T. (1986). Approach and escape responses -- to mesencephalic central gray stimulation in rats: effects -- of morphine and naloxone. Behav. Brain Res., 22: 63-73.

- Ichitani Y, Iwasaki T y Satoh T. (1985). Effects of Naloxone and Chlordiazepoxide on lateral hypothalamic self-stimulation in rats. Physiol. Behav., 34: 779-782.
- Inagaki S, Sakanaka M, Shiosak S, Senba E, Takatsuki K, Takaki H, Hawaii Y, Minagawa H y Tohyama M. (1982). Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. I: Forebrain and upper brainstem. Neuroscience, 7: 251-277.
- Iorio LC. (1981). SCH 23390, A benzazepine with atypical effects on dopaminergic systems. The Pharmacologist, 23: 136.
- Ito M y Olds J. (1971). Unit activity during self-stimulation behavior. J. Neurophysiol., 34: 263-273.
- Iversen LL. (1982) Psicofarmacología bioquímica del GABA. En: Psicofarmacología. Eds: MA Lipton; A Di Mascio y FF Killian. pp. 51-77. Raven Press. Espxs. Barcelona
- Iversen LL, Quirk M, Enson PC, Dowling JK y Watling KJ. (1980). -- Further evidence for the existence of multiple receptors for dopamine in the central nervous system. Receptors for neurotransmitters and peptide hormones. Raven Press, New York.
- Jaeger CB, Joh TH y Reis DJ. (1983). The effect of forebrain ---- lesions in the neonatal rat: survival of midbrain dopaminergic neurons and the crossed nigrostriatal projection. J. Comp. Neurol., 218: 74-90.
- Janas JD y Stellar JR. (1987). Effects of knife-cut lesions of the medial forebrain bundle in self-stimulating rats. Behav. ---- Neurosci., 101: 832-845.
- Johnson JL y Aprison MH. (1971). The distribution of glutamate and total free amino acids in thirteen specific regions of the -- cat CNS. Brain Res., 26: 141-148.
- Jones BE y Moore RY. (1974). Catecholamine-containing neurons of the nucleus locus coeruleus in the cat. J. Comp. Neurol., 157: 43-52.

- Jones BE, Halaris AE, Mc Ilhany M. y Robert Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I, Axonal ---- transport in central noradrenaline neurons. Brain Res., 127: 1-21.
- Jones BN, Paabo S y Stein S. (1981). Aminoacid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved ---- o-phthalaldehyde precolumn labelling procedure. J. Liquid -- Chromatogr., 4: 565-586.
- Joseph MH y Davis P. (1983). Electrochemical activity of o-phthalaldehyde mercaptoethanol derivatives of amino acids: Application to high performance liquid chromatographic determination of amino acids in plasma and other biological materials. J. - Chromatogr., 277: 125-136.
- Jung OH y Boyd ES. (1966). Effects of cholinergic drugs on self-stimulation response rates in rats. Am. Physiol., 210: 432- - 434.
- Justice JB y Neill DB. (1986). Interpretation of voltammetry in vivo using dialyzed perfusions. En: Neurochemical analysis of the concious brain: voltammetry and push-pull perfusion. (eds.) RD Myers and PG Knott. Ann. New York Acad. Sci., vol 473, pp 170-187.
- Justice JB, Wages SA y Michael AC. (1983). Interpretations of voltammetry in the striatum based on chromatography of striatal dialysate. J. Chromatogr., 6: 1873-1896.
- Kalsbeek A. (1989). The role of dopamine in development of the rat prefrontal cortex. Doctoral Thesis. University of Amsterdam, 217 pp.
- Keeseey RE y Powley TL. (1968). Enhanced lateral hypothalamic re- - ward sensitivity following septal lesions in the rat. Physiol. Behav., 3: 557-562.

- Keith B JF y Vaccarino FJ. (1983). Differential effects of amphetamine isomers on SN self-stimulation: evidence for DA neuron subtypes. Pharmacol. Biochem. Behav., 18: 747-751.
- Kelley AE, Stinus L e Iversen SD. (1980). Interaction between D-Ala-met-enkephalin, A10 dopaminergic neurons and spontaneous behaviour in the rat. Behav. Brain Res., 1: 24.
- Kelly PH. (1974). The physiological basis of reward and punishment. D. Phil. Thesis, Oxford University.
- Kelsey JE, Belluzzi JD y Stein L. (1984). Does naloxone suppress self-stimulation by decreasing reward or by increasing aversion?. Brain Res., 307: 55-59.
- Kemp JA, Foster AC y Wong EHF. (1987). Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptor. TINS, 10: 294-298.
- Kissinger PT, Hart JB y Adams RN. (1973). Voltammetry in the brain tissue. A new neurophysiological measurement. Brain Res., 55: 209-213.
- Kluver H y Barrera E. (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 12: 400-403.
- Koek W, Woods JH y Ornstein P. (1986). Phencyclidine-like behavioral effects in pigeon induce by systemic administration of the excitatory amino acid antagonist, 2-amino-5-phosphonovale rate. Life Sci., 39: 973-978.
- Kolb B. (1984). Functions of frontal cortex of the rat: A comparative review. Brain Research Reviews, 8: 65-98.
- Kolb B, Pittman K, Sutherland RJ y Whishaw IA. (1982). Dissociation of the contributions of the prefrontal cortex and dorso-medial thalamic nucleus to spatially guided behaviour in the rat. Behav. Brain Res., 6: 365-378.
- König JFR y Klippel RA. (1967). The rat brain. Krieger, Huntington New York.

- Koob GF, Fray PJ e Iversen SD. (1978). Self-stimulation of the lateral hypothalamus and locus coeruleus after specific unilateral lesions of the dopamine system. Brain Res., 146: 123-140.
- Korf J. (1986). Release of endogenous amino acids, dopamine and cyclic AMP from the rat brain: Methodological aspects and mutual interferences. En: Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltammetry and push-pull perfusion. (eds.) RD. Myers y PJ Knott. Annals of the New York Academy of Sciences, 473: 418-433.
- Korf J y Venema K. (1985). Amino acids in rat striatal dialysates: methodological aspects and changes after electroconvulsive shock. J. Neurochem., 45: 1341-1348.
- Kornblith CL, Ervin GN y King RA. (1978). Hypothalamic and locus coeruleus self-stimulation are decreased by cholecystokinin. Physiol. Behav., 21: 1037-1042.
- Kostrzewa RM y Jacobowitz DM. (1974). Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. Pharmacol. Rev., 26: 199-288.
- Krettek JE y Price JL. (1977a). The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J. Comp. Neurol., 171: 157-191.
- Krettek JE y Price JL. (1977b). Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. J. Comp. Neurol., 172: 687-722.
- Krieger DT. (1983). Brain peptides: what, where, and why?. Science, 222: 957-985.
- Kritzer MF, Innis RB y Goldman-Rakic PS. (1987). Regional distribution of cholecystokinin receptors in primate cerebral cortex determined by in vitro receptor autoradiography. J. Comp. Neurol., 263: 418-35.

- Kurosawa M, Sato A y Sato Y. (1989). Stimulation of the nucleus - basalis of Meiner increases acetylcholine release in the ce
rebral cortex in rats. Neurosci. Lett, 98: 45-50.
- Lee TF y Myers RD. (1986). Neurotensin release of endogenous ca-
techolamines from hypothalamus of the rat. En : Neurochemy--
cal Analysis of the Concious Brain: Voltammetry and Push- ---
Pull perfusion. (Eds.) RD Myers and P Knott. Ann. New York -
Acad. Science., 473 pp 509-511.
- Leonard CM. (1969). The prefrontal cortex of the rat. I: cortical
projections of the mediodorsal nucleus. II: efferent connec-
tions. Brain Res., 12: 321-343.
- Leonard CM. (1972). The connections of the dorsomedial nuclei. --
Brain Behav. and Evol., 6: 524-541.
- Lerma J, Herranz A, Herreras O, Abraira V y Martin del Rio R. ---
(1986). In vivo determination of extracellular concentration
of amino acids in the rat hippocampus. A method based on ---
brain dialysis and computerized analysis. Brain Res., 384: -
145-155.
- Lestang I, Cardo B, Roy MTy Valley L. (1985). Electrical self-sti
mulation deficits in the anterior and posterior parts of the
medial forebrain bundle after ibotenic acid lesion of the --
middle lateral hypothalamus. Neuroscience, 15: 379-388.
- Lewis DA, Campbell MJ y Morrison JH. (1986). An immunohistochemi-
cal characterization of somatostatin-28 and somatostatin-281
-12 in monkey prefrontal cortex. J. Comp. Neurol., 248:1-18.
- Liebman J y Segal SD. (1977). Differential effects of morphine --
and d-amphetamine on self-stimulation from closely adjacent
regions in rat midbrain. Brain Res., 136: 103-117.
- Lilly JC y Miller AM. (1962). Operant conditioning of the bottle-
nose dolphin with electrical stimulation of the brain. J. --
Comp. Physiol. Psychol., 55: 73-79.

- Linderfors L, Tossman V y Ungerstedt V. (1987). Subchronic haloperidol and sulpiride treatment induces region-specific changes in tissue levels of putative amino acids transmitters in rat - brain. Neurosci. Lett. 74: 90-94.
- Lindroth P y Mopper K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomoles amount amino acids by precolum fluorescence derivation with OPA. Anal.Chem., 51: 1667-1674.
- Lindvall O. (1974). Mesencephalic dopaminergic afferents to the lateral septal nucleus of the rat. Brain Res., 81: 325-331.
- Lindvall O y Bjorklund A. (1974). The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. Acta Physiol. Scand., supl. 412: 1-48.
- Lindvall O, Bjorklund A, Moore RY y Steveni U. (1974). Mesencephalic dopamine neurones projecting to neocortex. Brain Res., 81: 325-331.
- Lippa AS, Antelman SM, Fisher AE y Canfield DR. (1973). Neurochemical mediation of reward: a significant role for dopamine. - Pharmacol. Biochem. Behav., 1: 23-38.
- Livingston KE y Escobar A. (1971). Anatomical bias of the limbic system concept: A proposed reorientation. Arch. Neurol., 24: 17-21.
- Lorens SA. (1976a). Anatomical substrate of intracranial self-stimulation: Contribution of lesion studies. En: Brain stimulation reward. A Wauquier and ET Rolls (Eds.) pp 41-50. New York Elsevier.
- Lorens SA. (1976b). Comparison of the effects of morphine on hypothalamic and medial frontal cortex self-stimulation in the rat. Psychopharmacology, 48: 217-224.

- Lorens SA y Mitchell CL. (1973). Influence of morphine on lateral hypothalamic self-stimulation in the rat. Psychopharmacology, 32: 271-277.
- Lorens SA y Sainati (1978). Naloxone blocks the excitatory effect of ethanol and chlordiazepexide on lateral hypothalamic self-stimulation behavior. Life Science, 23: 1359-1364.
- Maeda H y Mogenson G. (1980). An electrophysiological study of -- inputs to neurons of the ventral tegmental area from the nu-- cleus accumbens and medial preoptic-anterior hypothalamic --- areas. Brain Res., 197: 365-377.
- Marley PD, Emson PC y Rehfeld JF. (1982). Effect of 6-hydroxidopa mine lesions of the medial forebrain bundle on the distribu-- tion of cholecystokinin in rat forebrain. Brain Res., 252: -- 382-385.
- Marsden CA, Brazell MP y Maidment NT. (1984). In vivo voltamme--- try-direct monitoring, an introduction to in vivo electroche-- mistry. En: Measurement of Neurotransmitter release in vivo. (Eds.) Marsden CA, pp 127-153, Wiley y Sons, New York.
- Martin GE. (1986). Catecholamine release within the striatum of -- the freely moving rat. En: Neurochemical Analysis of the Concious Brain: Voltammetry and Push-pull perfusion. RD Myers, y PJ Knott (Eds.) Annal of the New York Academy of Science. - vol. 473; pp 151-159
- Mashal RD, Owen F, Deakin JFW y Poulter M. (1983). The effects of cholecystokinin on dopaminergic mechanisms in rat striatum. Brain Res., 277: 375-376.
- Matsumoto H, Kikuchi S, e Ito M. (1982). Age-related changes in -- the glutamate metabolism of cerebral cortical slices from --- rats. Neurochemical Res., 7: 679-685.

- Mayo W, Bubojs B, Ploska A, Javay-Agid F, Agid Y, Le Moal M y Simon H. (1984). Cortical cholinergic projections from the basal forebrain of the rat with special reference to the prefrontal cortex innervation. Neuroscience Lett., 47: 149-154.
- McGeer PL y McGeer EG. (1981). Amino acid neurotransmitters. En: Basic Neurochemistry. (Eds.) GJ Siegel, RW Albers, BW Agranoff y R Katzman, pp. 233-253. Little Brown and Comp. Boston.
- McGregor GP, Woodhams PL, O'Shaughnessy DJ, Ghatel MA, Polak JM y Bloom SR. (1982). Developmental changes in bombesin, substance P, somatostatin and vaso-active intestinal polipeptide in the rat brain. Neuroscience Lett.; 28: 21-27.
- McIntosh FC y Oborin PE. (1953). Release of acetylcholine from intact cerebel cortex. (Abstr.). En: Abstracts of the XIX International Physiology Congress, pp. 580-581.
- Melusam MH, Mufson EJ, Wainer BH y Levey AI. (1983). Central cholinergic pathway in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch 1-Ch 6). Neuroscience, 10: 1185-1201.
- Miliaressis E, Bouchard A y Jacobowitz DM. (1975). Strong positive reward in median raphe: Specific inhibition by parachlorophenylalanine. Brain Res.; 98: 194-201.
- Miliaressis E, Malette J y Coulombe D. (1986). The effects of pimozide on the reinforcing efficacy of central grey stimulation in the rat. Behav. Brain Res., 21: 95-100.
- Moller SE. (1975). A method for the separation of plasma amino acid by ion-exchange chromatography combined with a semiautomated computation of plasma amino acid concentration. J. Chromatography, 104: 63-72.
- Mora F. (1978). The neurochemical substrates of prefrontal cortex self-stimulation: a review and a interpretation of some recent data. Life Sci., 22: 919-930.

- Mora F y Cobo M. (1990). The neurobiological basis of prefrontal - cortex self-stimulation: A review and an integrative hypothesis. En: The Prefrontal Cortex: its function, structure and - plasticity; Progress in Brain Research. HBM Llyllings, CG Van Eden, JPC De Bruin, MA Corner and MGP Feenstra (Eds.). Elsevier, Amsterdam (En prensa).
- Mora F y Ferrer JMR. (1986). Neurotransmitter pathways and circuits as the neural basis of self-stimulation of the prefrontal cortex in the rat: facts and speculations. En: The Neuronal Basis of Reward and Aversion. Beh. Brain Res., special issue vol. 22: 127-140.
- Mora F y Myers RD. (1977). Brain self-stimulation direct evidence for the involvement of dopamine in the prefrontal cortex. --- Science, 197: 1367-1389.
- Mora F y Myers RD. (1984). Regional synthesis of ¹⁴C-Amino acids - in cerebral cortex of the unanesthetized rat: simultaneous -- analysis by " push-pull " perfusion. Brain Res. Bull., 13: -- 421-426.
- Mora F, Sanguinetti AM, Rolls ET y Shaw SG. (1975). Differential - effects on self-stimulation and motor behaviour produced by - microintracranial injections of a dopamine receptor blocking agent. Neurosci. Lett., 1: 179-184.
- Mora F, Phillips AG, Koolhas JM y Rolls ET. (1976a). Prefrontal -- cortex and neostriatum self-stimulation in the rat: diferen-- tial effects produced by apomorphine. Brain Res. Bull., 1: -- 421-424.
- Mora F, Rolls ET, Burton MJ y Shaw SG. (1976b). Effects of dopami- ne-receptor blockade on self-stimulation in the monkey. Phar- macol. Biochem. Behav., 4: 211-216.
- Mora F, Sweeney F, Rolls ET y Sanguinetti AN. (1976c). Spontaneous firing rate of neurones in the prefrontal cortex of the rat: evidence for a dopaminergic inhibition. Brain Res., 116: 516- 522.

- Mora F, Myers RD y Sanguinetti AM. (1977). Self-stimulation of - the MFB or VTA after microinjection of haloperidol into the prefrontal cortex of the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 6: 236-241.
- Mora F, Avrith DB y Rolls ET. (1980). An electrophysiological and behavioural study of self-stimulation in the orbitofrontal -- cortex of the rhesus monkey. Brain Res. Bull., 5: 111-115.
- Mora F, Alba F, Sanguinetti AM, Rodríguez JM y Vives F. (1980b).-- Differential effects produced by an anticholinergic on the -- neuroleptic inhibition of motor behavior and self-stimulation of the prefrontal cortex in the rat. Brain Res. Bull., 5: --- 223-225.
- Mora F, Peinado JM y Myers RD. (1986). Amino acids profiles in -- cortex of concious rat: Recent studies and future perspecti-- ves. En: Neurochem. Analysis of the concious brain: Voltamme- try and push-pull perfusion. (Eds.) RD, Myers y PJ Knott. --- Annal. of the New York Academy of Science, vol. 473, pp 461-474.
- Moroni F y Popen G. (1984). The cortical cup technique. En: Measu- rement of Neurotransmitter Release in vivo. Marden C.A. (Eds.) pp 63-81. Wiley and sons. New York.
- Morris RGM, Anderson E, Lynch GS y Bandry M. (1986). Selective -- impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature, - 319: 774-776.
- Muller D, Jaly M y Lynch G. (1988). Contributions of quisqualate - and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. --- Science, 242: 1694-7.
- Muñoz C, Keller I y Huston JP. (1985). Evidence for a role of the preoptic area in lateral hypothalamic self-stimulation. Brain Res., 358: 85-95.

- Murrin LC y Roth RH. (1976). Dopaminergic neurons: effects of electrical stimulation on dopamine biosynthesis. Mol. Pharmacol., 12: 463-75.
- Myers RD. (1972). Methods for perfusing different structures of the brain. En: Methods in Psychobiology. RD Myers (Eds.) vol. 2, - pp. 169-211. Academic Press. London.
- Myers RD. (1986). Development of push-pull systems for perfusion of anatomically distinct regions of the brain of the awake animal. En: Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltammetry and push-pull perfusion. (Eds.) RD Myers and PJ Knott. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 473, pp 21-41.
- Myers RD y McCaleb ML. (1981). Peripheral and intrahypothalamic -- cholecystokinin act on noradrenergic " feeding circuit " in -- the rats diencephalon. Neuroscience, 6: 645-655.
- Myers RD y Mora F. (1977). In vivo neurochemical analysis, by ---- push-pull perfusion, of the mesocortical dopaminergic system - of the rat during self-stimulation. Brain Res. Bull., 2: 105-112.
- Nakajima S. (1976). Effects of intracranial chemical injection upon self-stimulation in the rat. Physiol. Behav., 8: 741-746.
- Nakajima S. (1984). Serotonergic mediation of hobenular self-stimulation in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 20: 859-862.
- Nakajima S y Baker JD. (1989). Effects of D2 dopamine receptor --- blockade with raclopride on intracranial self-stimulation and food-reinforced operant behaviour. Psychopharmacology, 89: 330-3.
- Nakajima S y McKenzie GM. (1986). Reduction of the rewarding ----- effect of brain stimulation by a blockade of dopamine D₁ receptor with SCH 23390. Pharmacol. Biochem Behav., 24: 919-923.

- Nassif S, Cardo B, Libersat F y Velley L. (1985). Comparison of - deficits in electrical self-stimulation after ibotenic acid - lesion of the lateral hypothalamus and the medial prefrontal cortex. Brain Research, 332: 247-257.
- Nazzaro JM, Seeger TF y Gardner EL. (1981). Morphine differentially effects ventral tegmental and substantia nigra brain reward thresholds. Pharmacol. Biochem. Behav., 14: 325-331.
- Nelson WT, Steiner SS, Brutus MM, Farrell R, y Ellman SJ. (1981) - Brain site variations in effects of morphine on electrical - self-stimulation. Psychopharmacology, 74: 58-65.
- Newman LM. (1972). Effects of cholinergic agonists and antagonists on self-stimulation behaviour in the rat. J. Comp. Physiol. - Psychol., 79: 394-413.
- Nicolaysen LC, Ikeda M, Justice JB Jr. y Neil DB. (1988). Dopamine release at behaviorally relevant parameters of nigrostriatal - stimulation: effects of current and frequency. Brain Res., 460 50-9.
- Nieto L. (1989). Analisis por HPLC de los amino-ácidos neurotransmisores liberados en el neostriado de la rata despierta utilizando la técnica de perfusion intracerebral push-pull. Ausencia de interferencias con la microcontaminacion hemática de -- las muestras. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
- Nieto L, Mora F y Peinado JM. (1989). Perfusión " push-pull " y -- aminoácidos neurotransmisores en el núcleo estriado: Ausencia de interferencias entre su liberación basal y la microcontaminación hemática de las muestras. Libro de Abstract del III Congreso Nacional de la SEN. pp 144. Sevilla.
- Nieuwenhuys R, Geeraedts IMG y Veening JG. (1982). The medial fore brain bundle of the rat. I. General introduction. J. Comp Neurol., 206: 49-81.

- Ogden G y Foldi P. (1986). Amino acid analysis: An overview of current methods. Liquid Chromatography-Gas Chromatography, 5: 28-40.
- Okada Y, Nitsch-Hassler C, Kim JS, Bak IJ y Hassler J. (1971). -- Role of γ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system I. Regional distribution of GABA in rabbit, cat, guinea-pig and baboons CNS. Exp. Brain Res., 13: 514-518.
- Okuyama S y Aihara H. (1988). Effect of minaprine on synaptic transmission in the neocortex of the rat in vivo. Neuropharm., 27: 915-22.
- Olds J. (1960). Differentiation of rewards systems in the brain by electrical self-stimulation techniques. En: Electrical Studies on the Unanesthetized Brain. ER Ramsey, DS O'Doherty (Eds.), Paul Holber, New York.
- Olds J. (1976). Reward and drive neurons. En: Brain-stimulation reward. A Wauquier, ET Rolls (Eds.), North Holland, Amsterdam: 1-27
- Olds J y Milner P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. J. Comp. Physiol. Psychol., 47: 419-427.
- Olds J y Olds ME. (1965). Drives, rewards, and the brain. En: New Directions in Psychology II. F Barron, VC Dement. (Eds.). -- Holt Rinehart and Winston, New York.
- Olds J y Travis RP. (1960). Effects of chlorpromazine, meprobamate, pentobarbital and morphine on self-stimulation. J. Pharmacol. Exp. Ther., 128: 397-404.
- Olds ME. (1975). Effects of intraventricular 6-hydroxydopamine and replacement therapy with norepinephrine, dopamine and serotonin on self-stimulation in diencephalic and mesencephalic regions in the rat. Brain Res., 98: 327-42.

- Olds ME. (1982). Reinforcing effects of morphine in the nucleus -- accumbens. Brain Res., 237: 429-440.
- Olds ME y Fobes JJ. (1981). The central basis of motivation: intracranial self-stimulation studies. Ann. Rev. Psychol., 32: 523-574.
- Olds ME y Olds J. (1963). Approach-avoidance analysis of rat diencephalon. J. Comp Neurol., 120: 259-295.
- Olds ME y Olds J. (1969). Effects of lesions in medial forebrain bundle on self-stimulation behavior. Am. J. Physiol., 217: -- 1253-1264.
- Olds ME y Williams KN. (1980). Self-administration of D-alanet en kephalimide at hypothalamic self-stimulation sites. Brain Res., In press
- Olney JW. (1978). Kainic acid as a tool in neurobiology. Eds: EG McGeer, JW Olney, y PL McGeer. pp, 95-121. Raven Press. New York.
- O'Neil RD y Fillenz M. (1986). Microcomputer-controlled voltammetry in the analysis of transmitter release in rat brain. En : Neurochemical analysis of the concious brain: Voltammetry and push-pull perfusion. (Eds.) RD Myers y PJ Knott. Annals of -- the New York Academy of Science, vol. 473. pp. 337-348.
- Ornstein K y Huston J P_ (1975). Influence of 6-hydroxidopamine in jections in the substantia nigra on lateral hypothalamic reinforcement. Neurosci. Lett., 1: 339-342.
- Ottersen OP y Storm-Mathisen J. (1984). Glutamate and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. J. Comp. Neurology, 229: 374-429.
- Park Mr, Imai H y Katai ST. (1982). Morphology and intracellular responses of an identified dorsal raphe projection. Brain Res. 240: 321-326.

- Peinado JM y Mora F. (1986). Glutamic acid as a putative transmitter of the interhemispheric corticocortical connections in the rat. J. Neurochem., 47: 1598-1603.
- Peinado JM y Myers RD. (1988). In vivo analysis of cortical amino acid neurotransmitters collected in the rat by a new double-lumen push-pull catheter system. Neuroscience, 24: 1027-34.
- Peinado JM, Gomez-Capilla JA y Mora F. (1984). Cerebral cortex -- and amino acid neurotransmitters: Higher levels of aspartic acid but not GABA in the frontal cortex of the rat. Brain Res. Bull., 12: 625-627.
- Peinado JM, McManus KT y Myers RD. (1986). Rapid method for microanalysis of endogenous amino acid neurotransmitter in brain perfusates in rat by isocratic HPLC-EC. Journal of Neurosci. Methods, 18: 269-276.
- Peinado JM, Iribar MC y Myers RD. (1987). Hemidecortication selectively alters release of glutamate in perfusates collected from cerebral cortex of unrestrained rats. Neurochem. Res., 12: 629-34.
- Perry W, Esposito RU y Kornetsky C. (1981). Effects of chronic -- naloxone treatment on brain-stimulation reward. Pharmacol. Biochem. Behav., 14: 247-249.
- Pert CB y Snyder SM. (1973). Properties of opiate-receptor binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 70: 2243-47.
- Phillips AG. (1984). Brain reward circuitry: a case for separate -- systems. Brain Res. Bull, 12: 195-201.
- Phillips AG y Fibiger HC. (1973). Dopamine and noradrenergic ---- substrates of positive reinforcement: differential effects of d-and-l-amphetamine. Science, 179: 575-577.

- Phillips AG y Fibiger HC. (1978). The role of dopamine in maintaining intracranial self-stimulation in the ventral tegmentum, nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. Canad. J. Psychol., 32: 58-66.
- Phillips AG y Mogenson GJ. (1969). Self-stimulation of the olfactory bulb. Physiol. Behav., 4: 196-197.
- Phillips AG, Carter DA y Fibiger HC. (1976a). Dopaminergic substrates of intracranial self-stimulation in the caudate-putamen. - Brain Res., 104: 221-232.
- Phillips AG, Carter DA y Fibiger HC. (1976b). Differential effects of parachlorophenylalanine on self-stimulation in caudate putamen and lateral hypothalamus. Psychopharmacology, 49: 23-27.
- Phillips AG, Mora F y Rolls ET. (1979). Intracranial self-stimulation in orbitofrontal cortex and caudate nucleus of rhesus monkey: effects of apomorphine, pimozide and spiroperidol. Psychopharmacology, 62: 79-82.
- Phillips AG, Mora F y Rolls ET. (1981). Intracerebral self-administration of amphetamine by rhesus monkeys. Neurosci Lett., 24: 81-86.
- Phillips AG, Jakubovic A and Fibiger HC. (1987). Increased in vivo tyrosine hydroxylase activity in rat telencephalon produced by self-stimulation of ventral tegmental area. Brain Res., 402: 109-116.
- Phillipson OT y González CB. (1983). Distribution of axons showing neurophysing-like immunoreactivity in cortical and anterior basal forebrain sites. Brain Res., 258: 33-44.
- Porrino LJ, Espósito RU, Seeger TF, Grane AM, Peut A y Sokoloff L. (1984). Metabolic mapping of the brain during rewarding self-stimulation. Science, 224: 306-309.

- Poschel BPH y Ninteman FW. (1971). Intracranial reward and the -- forebrain's serotonergic mechanism: studies employing para-- chlorophenilalanina and para chloraamphetamine. Physiol. --- behav., 7: 39-46.
- Pradhan SN. (1976). Balance of central neurotransmitter actions -- in self-stimulation behavior. En: Brain-Stimulation Reward. A Wauquier, ET Rolls (Eds.) North Holland, Amsterdam: 171-186.
- Pradhan SN y Bowling C. (1971). Effects of nicotine on self-stimu- lation in rats. J. Pharmac. Exp. Ther., 176: 229-243.
- Pradhan SN y Dutta SN. (1971). Central cholinergic mechanism and behaviour. En: International Review of Neurobiology. (Eds.) Pfeiffer CC y Smythies JR. vol. 14 pp 173-321. Academic ---- Press, New York.
- Pradhan SN y Kamata KA. (1972). Action and interaction of choliner- gic agonist and antagonist on self-stimulation. Arch. Int. - Pharmac. Ther., 196: 321-329.
- Predy PA y Kokkinidis L. (1984). Sensitization to the effects of repeated amphetamine administration on intracranial self-sti- mulation: evidence for changes in reward processes. Beh. --- Brain Res., 13: 251-259.
- Pritzel M, Sartev M, Morgan M y Huston JP. (1983) Interhemispheric nigrostriatal projections in the rat: bifurcating nigral pro- jections and loci crossing in the diencephalon. Brain Res., - Bull., 10: 385-390.
- Quirion R, Gaudreau P, ST-Pierre S, Rioux F y Pert CB. (1982). -- Autoradiographic distribution of (³H)-neurotensin receptors in rat brain: visualization by tritium-sensitive film. Pepti- des, 3: 757-763.
- Ramirez M, Alba F, Vives F, Mora F y Osorio C. (1983). Monoamines and self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat. Rev. Esp. Fisiol., 39: 351-356.

- Ramirez VD, Chen JC, Nduka E, Lin W y Ramirez AD. (1986). Push- pull perfusion of the hypothalamus and the caudate nucleus in conscious unrestrained animals. En: Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltammetry and push-pull perfusion. (Eds) RD Myers and PJ Knott. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 473, pp 434-448.
- Reid LD, Hubbell CL, Dunn LL, Hunter GA y Costa T. (1985). Selected opiods and responding for intracranial reinforcement. Neuropeptides, 5: 331.
- Ritter S y Stein L. (1973). Self-stimulation of noradrenergic cell group (A 6) in locus coeruleus of rats. J. Comp Physiol. Psychol., 85: 443-452.
- Roberts WW. (1968). Both rewarding and punishing effects from stimulation of posterior hypothalamus of cat with same electrode and same intensity. J. Comp. Physiol. Psychol., 51: 400-407.
- Robertson A y Mogenson GJ. (1979). Facilitation of self-stimulation of the prefrontal cortex in rats following chronic administration of spiroperidol or amphetamine. Psychopharmacol. (Berlin), 65: 149-154.
- Robertson A, Lafeniére A y Franklin KB. (1981). Amphetamine and increases in current modulate reward in the hypothalamus and substantia nigra but not in the prefrontal cortex. Physiol. Behav., 26: 809- 813.
- Robertson A, Lafeniére A y Milner PM. (1986a). The role of corticocortical projections in self-stimulation of the prelimbic and sulcal prefrontal cortex in rats. Behav. Brain Res., 21: 129-142.
- Robertson A, Lafeniére A y Milner PM. (1986b). Distinct substrate influence the acognition of self-stimulation of the hippocampus and the prefrontal cortex. Physiol. Behav., 37: 409-418.

- Rolls SK. (1970). Intracranial self-stimulation and wakefulness: - effects of manipulating ambient catecholamines. Science, 168: 1370-1372.
- Rolls ET. (1972). Activation of amygdaloid neurones in reward, -- eating and drinking elicited by electrical stimulation of -- the brain. Brain Res., 45: 365-381.
- Rolls ET. (1974). The neuronal basis of brain stimulation reward. Proc. in Neurobiol., 3: 71-160.
- Rolls ET. (1975). The Brain and Reward. Pergamon Press, Oxford.
- Rolls ET y Cooper SJ. (1973). Activation of neurones in the pre-- frontal cortex by brain stimulation reward in the rat. Brain Res., 60: 351-368.
- Rolls ET. Burton MJ y Mora F. (1980). Neurophysiological analysis of brain-stimulation reward in the monkey. Brain Res., 194: 339-357.
- Rompré PP y Miliaressis B. (1987). Behavioural determination of - refractory periods of the brainstem substrates of self-stimu- lation. Behav. Brain Res., 23: 205-219.
- Rompré PP y Shizgal P. (1986). Electrophysiological characteris-- tics of neurone in forebrain regions implicated in self-sti- mulation of the medial forebrain bundle in the rat. Brain -- Res., 364: 338-349.
- Rompré PP y Wise RA. (1989a). Behavioural evidence for midbrain - dopamine depolarization inactivation. Brain Res., 477: 152-6.
- Rompré PP y Wise RA. (1989b). Opioid-neuroleptic interaction in - brainstem self-stimulation. Brain Res., 477: 144-51.
- Rose JE y Woolsey CN. (1984). The orbitofrontal cortex and its -- connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep -- and cat. Res. Publ. Ass. Neurol. Ment. Dis., 27: 210-232.

- Rothman SM y Olney JW. (1987). Excitotoxicity and NMDA receptor. TINS, 10: 299-302.
- Routtenberg A. (1971). Forebrain pathways of reward in *rattus norvegicus*. J. Comp. Physiol. Psychol., 75: 269-276.
- Routtenberg A. (1976). Self-stimulation pathways: origins and terminations a three-stage technique. En: Brain-Stimulation Reward. A Wauquier, ET Rolls (Eds.), North Holland, Amsterdam: 31-39.
- Routtenberg A. (1978). The reward system of the brain. Sci. Am., - 239: 159-164.
- Routtenberg A y Huang YH. (1968). Reticular portion and brain --- stem unitary activity: effects of posterior hypothalamic and septal-limbic stimulation and reward loci. Physiol. Behav., 3: 611-617.
- Routtenberg A y Malsbury C. (1969). Brainstem pathways of reward. J. Comp. Physiol. Psychol., 68: 22-30.
- Routtenberg A y Sloan H. (1972). Self-stimulation in the prefrontal cortex of the *rattus norvegicus*. Behav. Biol., 7: 567-572.
- Sabater R, Saez JA, Mora F y Ferrer JMR. (1989). D₁ dopamine receptor mediates self-stimulation of the prefrontal cortex in the rat. Libro de Abstract del III Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neurociencia. Sevilla.
- Saint-Laurent J, Leclerc R y Mitchel M. (1973). Autostimulation - des noyaux du raphe et exploration diffuse. J. Physiol., 66: 87-92.
- Sakanaka M, Shiosaka S, Takatsuki K y Tohyama M. (1983). Evidence for the existence of a substance P-containing pathway from --- the nucleus laterodorsalis tegmenti (Castaldi) to the medial frontal cortex in the rat. Brain Res., 259: 123-126.

- Sandberg M, Butcher S y Hagberg H. (1986). Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. J. Neurochem., 47: 178-184.
- Sarter M y Markowitsch HJ. (1983a). Convergence of basolateral - amygdaloid and mediodorsal thalamic projections in different areas of the frontal cortex in the rat Brain Res. Bull., 10: 607-622.
- Sarter M y Markowitsch HJ. (1983b). Cognitive functions of the -- basolateral limbic circuit: functional interaction of the basolateral amygdala with prefrontal areas and the mediodorsal thalamic nucleus as studied using different tasks and selective lesions. Neurosci. Lett., 14: 5-322.
- Schaefer GJ y Michael RP. (1981). Threshold difference for naloxone and naltrexone in the hypothalamus and mid-brain using fixed ratio brain self-stimulation in rats. Psychopharmacology 74: 17-22.
- Schenk S y Shizgal P. (1982). The substrates for lateral hypothalamic and medial prefrontal cortex self-stimulation have different refractory periods and show poor spatial summation. - Physiol. Behav., 28: 133-138.
- Schenk S y Shizgal P. (1985). The substrates for self-stimulation of the lateral hypothalamus and medial prefrontal cortex: A comparison of strength-duration characteristics. Physiol. Behav., 34: 943-949.
- Schenk S, Coupal A, Williams T y Shizgal P. (1981). A within-subject comparison of the effects of morphine on lateral hypothalamic and central gray self-stimulation. Pharmacol. Biochem. Behav., 15: 37-41.

- Schmitt P, Abou-Hamed H y Karli P. (1977). Effects aversifs et -
appétitifs induits par stimulation mésentencéphalique et hypo-
thalamique. Brain Res., 130: 521-530.
- Schwartz R, Fuxe K, Hokfelt T, Terenius L y Goldstein M. (1980).
Effects of chronic striatal kainate lesions on some dopami--
nergic parameters and encephalin immunoreactive neurons in -
the basal ganglia. J. Neurochem., 34: 772-778.
- Schwartz ML, Zheng DS y Goldman-Rakic PS. (1988). Periodicity of
GABA-containing cells in primate prefrontal cortex. J. ----
Neuroscien., 8: 1962-1970.
- Segal M y Bloom FE. (1974). The action of norepinephrine on the
rat hippocampus. III: activation of the input pathway. Brain
Res., 72: 99-114.
- Seguela P, Watkins KC y Descarries L. (1988). Ultrastructural -
features of dopamine axons terminals in the anteromedial and
suprarhinal cortex of the rat. Brain Res., 442: 11-22.
- Sem-Jacobsen CW y Torkildsen A. (1960). Depth recording and elec-
trical stimulation in the human brain. En: Electrical Studies
on the Unanesthetized Brain. ER Ramsey, y DS O'Doherty (eds)
Hoebner New York.
- Sharp T, Carlsson A, Zetterström T, Lundström K y Ungerstedt V.
(1986). Rapid measurement of dopamine release using brain --
dialysis combined with microbore HPLC. En: Neurochemical Ana-
lysis of the conscious brain: Voltammetry and push-pull perfu-
sion. (Eds.) RD Myers and PJ Knott. Annals of New York Acade-
my of Science. vol, 473, pp 512-15
- Shaw SG, Vives F y Mora F. (1984). Opioid peptides and self-sti-
mulation of the medial prefrontal cortex in the rat. Psycho-
pharmacology, 83: 288-292.

- Shizgal P, Bielajew C, Corbett D, Skelton R y Yeomans J. (1980). Behavioural methods for inferring anatomical linkage between rewarding brain stimulation site. J. Comp. Physiol. Psychol., 94: 227-237.
- Shults CW, Quirion R, Chronwall B, Chase TN y Odonohve TL. (1984) A comparison of the anatomical distribution of substance P -- and substance P receptors in the rat central nervous system. Peptides, 5: 1097-1128.
- Shute CCD y Lewis PR. (1967). The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections Brain, 90: 497-520.
- Silverman JA y Corbett D. (1989). Prefrontal cortex lesions attenuate substantia nigra self-stimulation: a reward summation analysis. Behav. Brain Res., 32: 43-50.
- Simantov R, Kuhar MJ, Pasternak GW y Snyder SH. (1976). The regional distribution of a morphine-like factor enkephalin in monkey brain. Brain Res., 106: 189-197.
- Simantov R, Kuhar MJ, Uhl GR y Snyder SH. (1977). Opioid peptide enkephalin: Immunohistochemical mapping in rat central neurons system. Proc. Natu. Acad. Sci. U.S.A., 74: 2167-2171.
- Simon H, Le Moal M. y Cardo R. (1976). Intracranial self-stimulations from the dorsal raphe nucleus of the rat: effects of -- the injection of parachlorophenylalanine and of alphanethyl-- paratyrosine. Behav. Biol., 16: 353-364.
- Simon H, Stinus L, Tassin JP, Lavielle S, Blanc G, Thierry AM, --- Glowinski J and LeMoal M. (1979). Is the dopaminergic meso-- cortico-limbic system necessary for intracranial self-stimula-- tion?. Behav. Neurol. Biol., 27: 125-145.

- Simon RP, Swan JH, Griffiths T y Meldrum BS. (1984). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. Science, 226: 850-52.
- Smith RJ y Panico KA. (1985). Automated analysis of O-phthalaldehyde derivatives of amino acid in physiological fluids by reverse phase high performance liquid chromatography. J. Liquid Chromatography, 8: 1783-1795.
- Smith BR, Brown ZW y Amit Z. (1982). Intraventricular self-administration of leucine enkephalin by laboratory rats. Life Sci. 31: 1527-1530.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C y Des Rosiers M. (1977). The ^{14}C -deoxyglucose method for measurement of local cerebral glucose utilization. Theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. J. Neurochem., 28: 897 - 916.
- Stamford JA, Kruk ZL y Millar J. (1986). Sub-second striatal dopamine release measured by in vivo voltammetry. Brain Res., 381: 351-355.
- Stamford JA, Kruk ZL y Millar J. (1988). Stimulated limbic and striated dopamine release measured by fast cyclic voltammetry: Anatomical, electrochemical and pharmacological characterization. Brain Res., 454: 282-288.
- Stapleton JM, Merriman VJ, Coogle CL, Gelbard SD y Reid LD. (1979) Naloxone reduces pressing for intracranial stimulation of sites in the periaqueductal gray area, accumbens nucleus, substantia nigra and lateral hypothalamus. Physiol. Psychol., 7: 427-436.
- Stark P y Boyd ES. (1963). Effects of cholinergic drugs on hypothalamic self-stimulation responses in dogs. Amer. J. Physiol., 205: 745-758.

- Starr MS. (1982). Influence of peptides on H^3 -dopamine release - from superfused rat striatal slices. Neurochem. Int., 4: --- 233-240.
- Stein EA. (1985). Effects of intracranial self-stimulation on --- brain opioid peptides. Peptides, 6: 67-73.
- Stein L. (1962). Effects and interaction of imipramine, chlorpromazine, reserpine and amphetamine on self-stimulation: possible neurophysiological basis of depression. Recent. Adv. --- Biol. Psychiatry, 4: 288-308.
- Stein L. (1964). Self-stimulation of the brain and the central -- stimulant action of amphetamine. Fed. Proc., 23: 836-50.
- Stein L. (1968). Chemistry reward and punishment. En: Psychopharmacology: A Review of Progress, 1957-1967. D Efron (Eds.), PHS Publi., nº 1836, Washinton DC, GPO: 105-123.
- Stein L. (1971). Neurochemistry of reward and punishment: some -- implications for the etiology of schizophrenia. J. Psychiat. Res., 8: 345-361.
- Stein L. (1978). Reward transmitters: catecholamines and opioid - peptides. En: Psychopharmacology: A Generation of Progress - M Lipton, A DiMascio, y K Killam (Eds.), Raven, New York: -- 569-581.
- Stein L y Belluzzi JD. (1978). Brain endorphins and the sense of wellbeing. Adv. Biochem, Psychopharmacol., 18: 299-311.
- Stein L y Belluzzi JD. (1979). Brain endorphins: possible roles in reward memory information. Federation Proc., 38: 2468- -- 2472.
- Stein L y Ray OS. (1959). Self-regulation of brain stimulating - current intensity in the rat. Science, 130: 570-572.

- Stein L y Wise CD. (1969). Release of norepinephrine from hypothalamus and amygdala by rewarding medial forebrain bundle stimulation and amphetamine. J. Comp. Physiol. Psychol., 67: 189-98.
- Stellar JR y Corbett D. (1989). Regional neuroleptic microinjections indicate a role for nucleus accumbens in lateral hypothalamic self-stimulation reward. Brain Res., 477. 126-43.
- Stellar JR y Neeley SP. (1982). Reward summation function measurements of lateral hypothalamic stimulation reward: Effects of anterior and posterior medial forebrain bundle lesion. En: The Neural Basis of Feeding and Reward. (Eds.) BG Hoebel, y D Novin, pp. 431-443. Brunswick ME, Haer Institute.
- Stellar JR, Illes J y Mills LE. (1982). Role of ipsilateral forebrain in lateral hypothalamic stimulation reward in rats. — Physiol. Behav., 29: 1089-1097.
- Stellar JR, Kelley AE y Corbett D. (1983). Effects of peripheral and central dopamine blockade on lateral hypothalamic self-stimulation: evidence for both reward and motor deficits. — Pharmacol. Biochem. Behav., 18: 433-42.
- Stengaard-Pedersen K y Larson LJ. (1981). Comparative immunocytochemical localization of putative opioid ligands in the central nervous system. Histochemistry, 73: 89-114.
- Stephens DN y Herberg LJ. (1979). Dopamine-acetylcholine "balance" in nucleus accumbens and corpus striatum and its effects on hypothalamic self-stimulation. Eur. J. Pharmacol., 54: 331-339.
- Stilwell DJ, Levitt RA, Horn CA, Irvin MD, Gross K, Parsons DS, -- Scott RH y Bradley EL. (1980). Naloxone and shuttlebox self-stimulation in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 13: 739-742.

- Surtees L y Collins GGS. (1985). Receptor types mediating the excitatory actions of exogenous L-aspartate and L-glutamate in rat olfactory cortex. Brain Res., 334: 287-295.
- Szerb JC. (1988). Changes in the relative amounts of aspartate and glutamate released and retained in hippocampal slices during stimulation. J. Neurochem., 50: 219-224.
- Takeichi T, Kurumiya S, Unemoto M y Olds ME. (1986). Roles of catecholamine terminals and intrinsic neurons of the ventral tegmentum in self-stimulation investigated in neonatally dopamine-depleted rats. Pharmacol. Biochem. Behav., 24: 1101-1109.
- Takeigawa M y Mogenson G. (1977). A study of inputs to antidromically identified neurons of the locus coeruleus. Brain Res., 135: 217-230.
- Tassin JP, Bockevt J, Blanc G, Stimus L, Thierry AM, Laviell S, Premont J y Glowinski J. (1978). Topographical distribution of dopaminergic innervation and dopaminergic receptors of the anterior cerebral cortex of the rat. Brain Res., 154: 241-251.
- Thecinga KH, Baud J y Fagg GE. (1989). Acidic amino acid transmitters release: a novel methodological approach. Abstract of 12th Annual Meeting of the ENA. European J. Neurosci., suppl. 2: 117.
- Thierry AM, Blanc G, Sobel A, Stimus L y Glowinski J. (1973). Dopaminergic terminals in the rat cortex. Science, 182: 499-501.
- Thierry AM, Tassin JP, Blanc G y Glowinski J. (1976). Topographic and pharmacological study of the mesocortical dopaminergic system. En: Brain-Stimulation Reward. A Wauquier, ET Rolls (Eds.), North Holland, Amsterdam: 290-293.
- Thierry AM, Le Douarin C, Penit J, Ferron A y Glowinski J. (1986) Variation in the ability of neuroleptics to block the inhibitory influence of dopaminergic neurons on the activity of cells in the rat prefrontal cortex. Brain Res. Bull., 16: 155-160.

- Tossman V y Ungerstedt V. (1986). Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acid in the rat brain. Acta Physiol. Scand., 128: 9-14.
- Tossman V, Jonsson G y Ungerstedt V. (1986a). Regional distribution and extracellular levels of amino acids in the central nervous system. Acta Physiol. Scand., 127: 533-545.
- Tossman V, Delin A, Eriksson LS y Ungerstedt V. (1987). Brain cortical amino acids measured by intracerebral dialysis in portocaval shunted rats. Neurochem. Res., 12: 265-269.
- Trujillo KA, Belluzzi JD y Stein L. (1983). Endorphins catecholamine interactions in nucleus accumbens self-stimulation. Soc. Neurosci. Abstr., 9: 227.
- Trujillo KA, Belluzzi JD y Stein L. (1984). Naltrexone and self-stimulation: extinction-like response pattern suggests selective reward deficit. Soc. Neurosci. Abstr., 10: 308.
- Trujillo KA, Belluzzi JD y Stein L. (1989). Opiate antagonists and self-stimulation: extinction-like response patterns suggest selective reward deficit. Brain Res., 492: 15-28.
- Turski L, Schwarz M, Turski WA, Klockgether T, Sontag KH y Collins JF. (1985). Muscle relaxant action of excitatory amino acid antagonists. Neurosci. Lett., 53: 321-326.
- Unemoto y Olds ME. (1981). Citado en: Olds ME, Fobes JL. The central basis of motivation: intracranial self-stimulation studies. Ann. Rev. Psychol., 32: pag. 550.
- Unemoto M, Takeichi T, Kurumiya S y Olds ME. (1984). Selective neonatal depletion of dopamine has no effects on medial prefrontal cortex self-stimulation in the rat. Neurosci. Res., 1: 295-307.
- Ungerstedt U. (1971). Stereotypic mapping of the monoamine pathways in the rat. Acta Physiol. Scand., supl. 367: 1-122.

- Ungerstedt U. (1984). Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. En: Measurements of Neurotransmitter Release in vivo. (Eds.) Marsden CA. pp 81-107. Wiley y Sons - New York.
- Unterwald EM y Kornetsky C. (1984). Effects of concomitant pentazocine and tripeleennamine on brain-stimulation reward. Pharmacol. Biochem. Behav., 21: 961-64.
- Unterwald EM y Kornetsky C. (1986). Effects of nalbuphine alone -- and in combination with tripeleennamine on rewarding brain -- stimulation in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 25: 629-32.
- Ursin R, Ursin H y Olds J. (1966). Self-stimulation of hippocampus in rats. J. Comp. Physiol. Psychol., 61: 353-359.
- Valenstein ES. (1969). Behavior elicited by hypothalamic stimulation. A prepotency hypothesis. Brain Behav. Evol., 2: 295-316.
- Valenstein ES y Campbell JF. (1966). Medial forebrain bundle lateral hypothalamic area and reinforcing brain stimulation. Am. J. Physiol., 210: 270-274.
- Vanderhaegen JJ, Signease JC y Gepts W. (1975). New peptides in -- the vertebrate CNS reacting with antipastrin antibodies. Nature, 257: 603-605.
- Van Der Kooy D y Phillips AG. (1977). Trigeminal substrates of intracranial self-stimulation of the prefrontal cortex. Fed. -- Proc., 39: 1095.
- Van Der Kooy D, Fibiger HC y Phillips AG. (1977a). Monoamine involvement in hippocampal self-stimulation. Brain Res., 136: 119-130.
- Van Der Kooy D, Fibiger HC y Phillips AG. (1977b). An analysis of dorsal and median raphe self-stimulation: Effects of parachlorophenylalanine. Pharmacol. Biochem. Behav., 8: 441-445.

- Van Der Kooy D, Le Piacé FG y Phillips AG. (1977c). Apparent independence of opiate reinforcement and electrical self-stimulation systems in rat brain. Life Science. 20: 981-986.
- Van Eden CG, Hoomeman EMD, Buijs RM, Matthijseen MAH, Geffard M y Vylings HBM. (1987). Immunocytochemical localization of dopamine in the prefrontal cortex of the rat at the light and electron microscopical level. Neurosci., 22: 849-862.
- Van Wolfswinkel L, Seifert WF y Van Ree JM. (1988). Catecholamines and endogenous opioids in ventral tegmental self-stimulation reward. Pharmacol. Biochem. Behav., 30: 589-95.
- Velley L. (1985). Unilateral lesion of the intrinsic cells in the medial forebrain bundle depresses self-stimulation but not stimulus-bound locomotor activity. Neurosci. Lett., 57: 199-204.
- Velley L, Chaminade C, Roy MT, Kempt E y Cardo B. (1983). Intrinsic neurons are involved in lateral hypothalamic self-stimulation. Brain Res., 268: 79-86.
- Venema K, Leever W, Bakker JO, Haayer G y Korf J. (1983). Automated precolumn derivatization device to determine neurotransmitters and other amino acid by reversed phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 260: 371-376.
- Vives F y Mora F. (1986). Effects of agonists and antagonists of cholinergic receptors on self-stimulation of the medial prefrontal cortex of the rat. Gen. Pharmac., 17: 63-67.
- Vives F, Gayoso MJ, Osorio C y Mora F. (1983). Afferent pathways to points of self-stimulation in the medial prefrontal cortex of the rat as revealed by the horseradish peroxidase technique. Behav. Brain Res., 8: 23-32.

- Vives F, Morales A y Mora F. (1986). Lesions of connections of -- the medial prefrontal cortex in rats: Differential effects -- on self-stimulation and spontaneous motor activity. Physiol. Behav., 36: 47-52.
- Vollenweider SX, Do QK, Rietschi L, Knöpfel T, Cuenod M y Gahwi-- ler BH. (1989). Release of endogenous amino acids by electrical stimulation of Schaffer collaterals in organotypic hippocampal slice cultures. Abstract of 12th Annual Meeting of -- the ENA. European J. Neurosci., suppl. 2: 114.
- Wages SA, Church WH y Justice JB. (1986). Sampling considerations for online microbore liquid chromatography of brain dialysis. Annl. Chem., 58: 1649-1656.
- Wainer BH, Levey AI, Mufson EJ y Melusam MM. (1984). Cholinergic systems in mammalian brain identified with antibodies against choline acetyltransferase. Neurochem. Int., 6: 163-182.
- Walker JE. (1983). Glutamate, GABA and CNS disease: a review. Neurochemical Res., 8: 521-550.
- Wang RY. (1981). Dopaminergic neurons in the rat ventral tegmental area. I. Identification and characterization. Brain Res. Rev., 3: 123-140.
- Wang RY y Aghajanian GK. (1977). Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. Brain Res., 132: 85-102.
- Waraczynski MA. (1988). Basal forebrain knife cuts and medial fore brain bundle self-stimulation. Brain Res., 438: 8-22.
- Watkins JC. (1981). Pharmacology of excitatory amino acid transmitters. En: Amino Acid Neurotransmitters. (Eds.) FV De Fendis y P. Mandel, pp. 205-212. Raven Press. New York.
- Watkins JC y Olverman HJ. (1987). Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. TINS, 10: 265-272.

- Wauquier A, Niemegeers CJE y Lal H. (1974). Differential antagonism by naloxone of inhibitory effects of haloperidol and morphine on brain self-stimulation. Psychopharma., 37: 303-310.
- Weibel SL y Wolf HH. (1978). Opiate modification of intracranial self-stimulation in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 10: 71-78.
- Weinberger DR. (1988). Schizophrenia and the frontal lobe. TINS, 11: 367-370.
- Weinberger DR y Wyatt RJ. (1981). En: Perspective in Schizophrenia Research. C Baxter, y Y Malnacluk (Eds.). Raven Press. -- New York. pp.29-41.
- Wessendorf MW, Proudfit HK y Anderson EG. (1981). The identification of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus by conduction velocity. Brain Res., 214: 168-173.
- West TE y Wise RA. (1988). Effects of naltrexone on nucleus accumbens, lateral hypothalamic and ventral tegmental self-stimulation rate-frequency functions. Brain Res., 462: 126-133.
- West CHK, Schaefer GJ y Michael RP. (1983). Increasing the work requirements lowers the threshold of naloxone for reducing self-stimulation in the midbrain of rats. Pharmacol. Biochem. Behav., 18: 705-710.
- Westerink BHC y Wirix E. (1983). On the significance of tyrosine for the synthesis and catabolism of dopamine in rat brain: evaluation by HPLC with electrochemical detection. J. Neurochem., 40: 758-764.
- Williams JT y Zieglgansberger W. (1981). Neurons in the frontal cortex of the rat carry multiple opiate receptors. Brain Res., 226: 304-308.

- Williams SP y Herberg LJ. (1987). Motivational vs motor effects - of striated and pallidal gabergic projections to subthalamic and entopeduncular nuclei, ventromedial thalamus and ventral globus pallidus. Pharmacol. Biochem. Behav., 26: 49-55.
- Wise CD, Berger ED y Stein L. (1973). Evidence of alfa-noradrenergic reward receptors and serotonergic punishment receptors in the rat brain. Biol. Psychiat., 6: 3-21.
- Wise RA. (1978). Catecholamine theories of reward: a critical review. Brain Res., 152: 215-247.
- Wise RA. (1982). Neuroleptics and operant behaviour: the anhedonia hypothesis. Behav. Brain Sc., 5: 39-87.
- Wise RA y Stein L. (1969). Facilitation of brain self-stimulation - by central administration of norepinephrine. Science, 163: - 299-301.
- Wishart y Herberg (1979). Central cholinergic mechanisms in electrical self-stimulation and in drug-induced tremor in rats. --- Pharmacol. Biochem. Behav., 11: 625-629.
- Wolfensberger M. (1979). Gas chromatography mass-spectrometry and selected ion monitoring of the N, N'-dipenta-fluoropropionyl hexafluoropropionyl esters of glutamine. J. Chromatography., - 172: 471-475.
- Wolfensberger M, Amsler V, Canzeck V y Cuenod H. (1982). Gas chromatographic method for the determination of trace amounts of putative amino acid from brain perfusates collected in vivo. J. Neurosci. Meth., 5: 253-260.
- Wurtz RH y Olds J. (1963). Amygdaloid stimulation and operant reinforcement in the rat. J. Comp. Physiol Psychol., 56: 941-949.
- Yadin E, Guarini V y Gallistel CR. (1983). Unilaterally activated systems in rats self-stimulating at sites in the medial forebrain bundle, medial prefrontal cortex or locus coeruleus. Brain Res., 266: 39-50.

- Yaksh TL y Yamamura HI. (1974). Factors affecting performance of the push-pull cannula in brain. J. Applied Physiol., 37: 428-434.
- Yeomans JS. (1975). Quantitative measurement of neural post-stimulation excitability with behavioural methods. Physiol. Behav. 15: 593-602.
- Yeomans JS. (1979). The absolute refractory periods of self-stimulation neurons. Physiol. Behav., 22: 911-919.
- Yin C y Mogenson G. (1980). Electrophysiological studies of neurons in the ventral tegmental area of Tsai. Brain Res., 181: 301-313.
- Young AMJ y Bradford HF. (1986). Excitatory amino acid neurotransmitters in the corticostriate pathway: studies using intracerebral microdialysis in vivo. J. Neurochem., 47: 1399-1404.
- Zetterstron T, Sharp T, Marsden CA y Ungerstedt U. (1983). In vivo measurement of DA and its metabolites by intracerebral dialysis: Changes after D-amphetamine. J. Neurochem., 41: 1769-1773.
- Zielke HR. (1985). Determination of amino acids in the brain by high performance liquid chromatography with isocratic elution and electrochemical detection. J. Chromatography., 347: 320-324.

APENDICE

1. ABREVIATURAS

- AMS: actividad motora espontánea
- ASP: ácido aspártico
- AVT: área ventrotegmenal
- CCK: colecistokinina
- CPM: corteza prefrontal medial
- DA: dopamina
- D-AP5: D-2-amino-fosfonovalerato
- 2-DG: 2-deoxiglucosa
- DGG: γ -D-glutamilglicina
- FPM: fascículo prosencefálico medial
- FPM-HL: fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral
- GLU: ácido glutámico
- GLU-TAU: γ -D-glutamiltaurina
- HPLC: cromatografía líquida de alta presión
- KA: Kainato
- L-AP-4: L-2-amino-fosfonobutirato
- LCRs: Líquido cefalorraquídeo sintético
- NA: noradrenalina
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- NT: neurotransmisores
- 6-OH-DA: 6-hidroxidopamina
- OPA-tertbutiltiol: o-ftaldialdehído-tertbutiltiol
- QA: quisqualato

- SP: sustancia P
- SS: autoestimulación
- VIP: péptido intestinal vasoactivo