

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

**INTERACCION DE NEUROTRANSMISORES EN
LA CORTEZA PREFRONTAL: ESTUDIOS
EN LA RATA DESPIERTA**

María Belén Sanz Barbero
Madrid, Marzo de 1995

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Francisco Mora Teruel, por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio; a mis compañeros de trabajo, Alberto, Macu, Gregorio, Rodrigo y Alberto porque de todos ellos he aprendido; a mis padres porque gracias a ellos los problemas informáticos de última hora han sido momentos entrañables. También mi agradecimiento al Prof. Albino García-Sacristán, por facilitarme parte de los animales de experimentación utilizados en esta Tesis Doctoral así, como al Taller de Asistencia a la Investigación de la Universidad Complutense, por su ayuda recibida. No puedo dejar de nombrar a Fernando, a María, a Llanos..... a todos ellos mi agradecimiento.

<u>ABREVIATURAS</u>	VI
<u>INTRODUCCION</u>	1
1.- CORTEZA PREFRONTAL	2
1.1 Definición y delimitaciones anatómicas	2
1.2 Aferencias	3
1.3 Eferencias	6
2.- NEUROTENSINA	8
2.1 Metabolismo de la neurotensina	8
2.2 Almacenamiento, liberación e inactivación de la neurotensina	10
2.3 Receptores de la neurotensina	10
2.4 Distribución y vías neurotensinérgicas	11
3.- DOPAMINA	12
3.1 Metabolismo de la dopamina	12
3.2 Almacenamiento, liberación e inactivación de la dopamina	13
3.3 Receptores de la dopamina	14
3.4 Distribución y vías dopaminérgicas	15
4.- ACETILCOLINA	18
4.1 Metabolismo de la acetilcolina	18
4.2 Almacenamiento, liberación e inactivación de la acetilcolina	19
4.3 Receptores de la acetilcolina	20
4.4 Distribución y vías acetilcolinérgicas	23
5.- AMINOACIDOS NEUROTRANSMISORES	25
5.1 Acido glutámico	25
5.1.1 Metabolismo del ácido glutámico	25
5.1.2 Almacenamiento, liberación e inactivación del ácido glutámico	26
5.1.3 Receptores del ácido glutámico	29
5.1.4 Distribución y vías glutamatérgicas	32

5.2 GABA	35
5.2.1 Metabolismo del GABA	35
5.2.2 Almacenamiento, liberación e inactivación del GABA	37
5.2.3 Receptores del GABA	39
5.2.4 Distribución y vías gabérgicas	41
6.- MAPA NEUROQUIMICO DE LA CORTEZA PREFRONTAL	44
6.1 Neurotensina	45
6.2 Dopamina	47
6.3 Acetilcolina	49
6.4 Aminoácidos neurotransmisores	51
6.4.1 Acido glutámico	51
6.4.2 GABA	52
7.- RESUMEN Y PLANTRAMIENTO	54
 MATERIALES Y METODOS	 58
1.- ANIMALES	59
2.- MATERIALES	60
2.1 Construcción de implantes para la perfusión intracerebral <i>in vivo</i>	60
2.2 Construcción del sistema de cánulas de perfusión <i>push-pull</i>	62
2.3 Preparación de Equithesin	63
2.4 Preparación de drogas	63
3.- METODOS EXPERIMENTALES	66
3.1 Procedimiento quirúrgico: estereotaxia	66
3.2 Perfusión Intracerebral <i>in vivo</i>	70
3.3 Análisis de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución	75
3.3.1 Cuantificación de aminoácidos como OPA-derivados	76
3.3.2 Condiciones cromatográficas	77
3.3.2.1 Factor de dilución	79
3.3.2.2 Calibración	80

3.3.2.3	Cálculo del coeficiente de variación	81
3.3.2.4	Curva de linealidad	83
4.-	HISTOLOGIA	85
5.-	MÉTODOS ESTADÍSTICOS	86
RESULTADOS		87
1.-	BLOQUE EXPERIMENTAL 1: Efecto de la perfusión intracortical de neurotensina y de neurotensina mas la inyección intraperitoneal de haloperidol sobre la concentración extracelular de GLU en la corteza prefrontal medial de la rata despierta	88
1.1	Acido glutámico	89
2.-	BLOQUE EXPERIMENTAL 2: Perfusión intracortical de apomorfina y de apomorfina mas la inyección intraperitoneal de haloperidol sobre la concentración extracelular de GLU y GABA en la corteza prefrontal medial de la rata despierta	93
2.1	Acido glutámico	94
2.2	GABA	97
3.-	BLOQUE EXPERIMENTAL 3: Efecto de las perfusión de agonistas/ antagonistas muscarínicos sobre la concentración extracelular de GLU y GABA en la corteza prefrontal medial de la rata despierta	101
3.1	Experimento 1: Efecto de la perfusión intracortical de arecolina sobre la concentración extracelular de GLU y GABA en la corteza prefrontal medial de la rata despierta	102
3.1.1	Acido glutámico	103
3.1.2	GABA	106
3.2	Experimento 2: Efecto de la inyección intraperitoneal de oxotremorina sobre la concentración extracelular de GLU y GABA en la corteza prefrontal medial de la rata despierta	110

3.2.1 Acido glutámico	111
3.2.2 GABA	114
3.3 Experimento 3: Efecto de la perfusión intracortical de McN-A-343 y de McN-A-343 tras la perfusión intracortical de pirenzepina sobre la concentración extracelular de GLU y GABA en la corteza prefrontal medial de la rata despierta	118
3.3.1 Acido glutámico	119
3.3.2 GABA	122
 DISCUSION	 126
 1.- ACERCA DE LOS METODOS	 127
1.1 Acerca del método de perfusión intracerebral <i>in vivo</i>	127
1.1.1 Diálisis vs. <i>push-pull</i>	129
1.1.2 <i>push-pull</i> discontinuo vs. <i>push-pull</i> continuo	129
1.2 Acerca del método de análisis de aminoácidos	132
1.2.1 De la derivación y cuantificación de aminoácidos	133
1.2.2 De las condiciones cromatográficas	134
1.2.3 De la variabilidad del método de análisis	136
2.- ACERCA DE LOS RESULTADOS	136
2.1 Acerca de la neurotensina	137
2.1.1 Interacción neurotensina-glutamato en la corteza prefrontal medial de la rata	137
2.2 Acerca de la dopamina	139
2.2.1 Interacción dopamina-glutamato en la corteza prefrontal medial de la rata	139
2.2.2 Interacción dopamina-GABA en la corteza prefrontal medial de la rata	141
2.3 Acerca de la acetilcolina	142
2.3.1 Interacción acetilcolina-glutamato en la corteza prefrontal medial de la rata	142

2.3.2 Interacción acetilcolina-GABA en la corteza prefrontal medial de la rata	144
<u>CONCLUSIONES</u>	146
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	149

ABRUVIATURAS:

ACh: Acetilcolina

ChACh: colina acetil esterasa

ChAT : colina acetil transferasa

AMPA: Ó-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato

APO: Apomorfin

ARE: Arecolina

AVT: Area tegmental ventral

COMT: catecol-o-metiltransferasa

CP: Corteza prefrontal

CPM: Corteza prefrontal medial

DA: Dopamina

GABA: Acido gamma amino butírico

[GABA]: Concentración extracelular de GABA

GABA-T: GABA transaminasa

GAD: GABA decarboxilasa

GLN: Glutamina

GLU: Acido glutámico

[GLU]: Concentración extracelular de GLU

HL: Haloperidol

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

iGluR: receptor glutamatérgico ionotrópico

KA: Kainato

LCRs: Líquido cefalorraquídeo sintético

MAO: Mono-amino-oxidasa

McN: McN-A-343

mGluR: receptor glutamatérgico metabotrópico

NMDA: N-metil-D-aspartato

NT: Neurotensina

6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina

OPA: o-ftaldialdehído

OXO: Oxotremorina

PZ: Pirenzepina

SNC: Sistema nervioso central

TH: tirosina hidroxilasa

INTRODUCCION

1.- CORTEZA PREFRONTAL.

1.1 Definición y delimitaciones anatómicas.

La corteza prefrontal (CP) ha sido definida en los primates como el área del lóbulo frontal que recibe las proyecciones corticales del núcleo dorsomedial del tálamo (Rose y Woolsey, 1948). Esta área se sitúa en la región más rostral del lóbulo frontal. Citoarquitectónicamente se caracteriza, en los primates, por tener una capa IV (granular interna) bien definida a diferencia del resto de la corteza frontal (Rosabal, 1967).

En contraposición al primate, en mamíferos inferiores tales como roedores, la corteza de la región más rostral del lóbulo frontal no posee una capa granular interna bien definida. La ausencia de esta característica condujo a varios autores a sugerir que la CP estaba ausente o era muy limitada en estas especies (Broadman, 1909). Posteriormente se descubrió (Rose y Woolsey, 1948) que el núcleo dorsomedial del tálamo en los roedores proyecta a un área de la corteza frontal, la corteza orbitofrontal, y se consideró que esta región cortical en los mamíferos inferiores equivalía a la CP de los primates. Estudios posteriores realizados por Leonard (1969, 1972) mostraron que las proyecciones del núcleo dorsomedial del tálamo en la rata no se limitan a la corteza orbitofrontal. Estos estudios fueron confirmados por Krettek y Price

(1977a, 1977b) y permitieron dividir la CP en dos regiones bien diferenciadas:

- Corteza prefrontal medial (CPM). Constituida por la mayor parte de la pared medial, anterior y dorsal a la rodilla del cuerpo calloso.
- Corteza prefrontal sulcal (u orbital). Constituida por la porción lateral del labio dorsal del surco rinal.

Citoarquitectónicamente, la CP se puede dividir en las siguientes áreas (Krettek y Price, 1977a, 1977b):

- Área precentral medial, que se corresponde parcialmente con el área 4 de Brodmann.
- Área cíngulada anterior, Área 24 de Brodmann.
- Área prelímbica, Área 32 de Brodmann.
- Área orbital ventral y lateral.
- Área agranular insular ventral y dorsal.

La corteza agranular ventral y la corteza orbital lateral se corresponden con la corteza prefrontal sulcal en los estudios de Leonard (1969, 1972). El resto de las áreas se corresponden con la CPM.

1.2 Aferencias

Mediante técnicas de transporte axonal retrógrado, Divac et al. (1978), realizaron un estudio detallado sobre las conexiones aferentes a la CP de la rata. Según este estudio se pueden distinguir cuatro grupos de vías

aferentes según su origen:

1.- Aferencias de la corteza y prosencéfalo basal:

Ambas subdivisiones de la CP, medial y sulcal, establecen conexiones recíprocas entre sí y reciben aferencias de la corteza contralateral, parietal, temporal y límbica (Cavada y Reinoso-Suárez, 1981a,b). Igualmente las dos subdivisiones reciben aferencias de la amígdala basolateral, claustro y núcleo magnoelular.

2.- Aferencias talámicas:

La CPM recibe aferencias del núcleo dorsomedial, anteromedial, intralaminar, paratentorial, axial, ventral, lateral y lateral inferior del tálamo. Estudios realizados por Vives et al., (1983) han mostrado aferencias a la CPM desde los núcleos parafascicular, anteroventral, ventromedial, ventrolateral, posteroventral, posteromedial y reuniens. Por su parte, la subdivisión sulcal de la CP recibe aferencias de los núcleos intralaminar, axial y lateral posterior del tálamo, además de las ya mencionadas del núcleo dorsomedial del tálamo.

Las proyecciones del núcleo dorsomedial del tálamo a la CP presentan una estricta sistematización topográfica. Dicho núcleo talámico se divide en un segmento central, un segmento lateral y un segmento medial, de forma que:

- La parte anterior del segmento medial proyecta sobre el área

prelímica. La parte posterior proyecta sobre el área insular agranular dorsal.

- El segmento lateral proyecta sobre el área cingular anterior y el área precentral medial.
- El segmento central proyecta sobre el área insular agranular ventral corteza orbital lateral. Estas dos áreas corresponden a la corteza prefrontal sulcal en los estudios de Leonard (1969, 1972).

Una de las características que presentan estas proyecciones es que las vías que parten de cada segmento del núcleo dorsomedial del tálamo no se superponen en la CP.

3.- Aferencias del área hipotalámica:

Ambas divisiones de la CP reciben aferencias del hipotálamo lateral, zona incierta y sustancia gris periventricular dorsal y lateral.

4.- Aferencias del mesencéfalo:

Ambas subdivisiones de la CP reciben aferencias de los núcleos del rafe dorsal y central, área tegmental ventral, sustancia negra, locus coeruleus y núcleo parabranchial, región medial del núcleo tegmental ventral de Gudden (Sarter y Markowitsch, 1983) y núcleo tegmental laterodorsal de Castaldi (Sakanaka et al., 1983).

1.3 Eferencias.

Las eferencias de la CP en la rata han sido estudiadas por Beckstead (1979). De este estudio se deduce que la CP establece un extenso sistema de proyección que puede dividirse en cinco grupos:

1.- Eferencias a corteza:

La CPM proyecta a las cortezas sulcal, retroesplénica, entorrinal y perirrinal y al presubiculo. La subdivisión sulcal proyecta a la CPM y a la corteza entorrinal lateral, porción anterior de la corteza piriforme y a presubiculo. Ambas subdivisiones reciben eferencias contralaterales.

2.- Eferencias a estriado y prosencéfalo basal:

Ambas subdivisiones de la CP proyectan sobre los núcleos caudado-putamen, accumbens, septum lateral, núcleo de la banda diagonal de Broca, tubérculo olfatorio, amígdala basal, lateral y central y claustro.

3.- Eferencias a núcleos talámicos:

En cuanto a las conexiones talámicas, la CPM proyecta sobre los núcleos dorsomedial, parafascicular paratenial, anteromedial, anteroventral, ventromedial, reuniens, romboidal, lateral posterior y habénula lateral. La corteza prefrontal sulcal proyecta sobre los núcleos talámicos dorsomedial, ventromedial, reticular, gelatinoso y reuniens.

4.- Eferencias al área hipotalámica:

La CPM proyecta a los núcleos hipotálamo lateral y posterior, área preóptica lateral, área supramamilar, pretectum, sustancia gris central y zona incierta. La corteza prefrontal sulcal proyecta a hipotálamo posterior y lateral y a área preóptica.

5.- Eferencias a mesencéfalo:

Ambas divisiones de la CP proyectan sobre el colículo superior, sustancia negra (parte compacta y menos en la reticular), área tegmental ventral, núcleo central superior de Bechterev, rafe dorsal y núcleos pontinos.

Como puede observarse, la CP establece conexiones recíprocas con las estructuras subcorticales estudiadas. No obstante, hay excepciones. Entre ellas cabe destacar las conexiones con los núcleos caudado-putamen, septum y accumbens, estructuras con las que la CP, al parecer, sólo establece conexiones eferentes.

2.- NEUROTENSINA

La neurotensina (NT) es un tridecapéptido (pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH) con función neurotransmisora y/o neuromoduladora (Kobayashi et al., 1977; Uhl et al., 1977; Nemeroff et al., 1983). Fue aislado por Carreyway y Leeman en 1973 y se denominó NT porque se aisló en cerebro y tenía actividad hipotensora (Carreyway y Leeman, 1973). La NT se localiza tanto en el SNC como en tejidos periféricos tales como intestino, páncreas, corazón y riñón (Kitabgi et al., 1992).

2.1 Metabolismo de la NT

La síntesis de NT se produce en el soma neuronal a partir de un precursor proteínico que posee 170 aminoácidos. El fragmento del propéptido que contiene el péptido NT se encuentra cerca del extremo carboxi terminal y está limitado a ambos lados por el par Lis-Arg (fig.1) (Dobner et al., 1987; Kitabgi et al., 1992).

En cuanto al catabolismo casi la totalidad de la NT se degrada en la hendidura sináptica por la acción de las siguientes peptidasas: endopeptidasa neutral 24.11, metaloendopeptidasa 24.15, metalopeptidasa 24.16, prolina endopeptidasa y angiotensina convertasa (fig.2) (Kitabgi et al., 1992). Tanto la distribución regional de las peptidasas como su

actividad enzimática es heterogénea, esto lleva consigo que la acumulación de los fragmentos de NT, algunos activos, varíe según las regiones cerebrales (Davis et al., 1992).

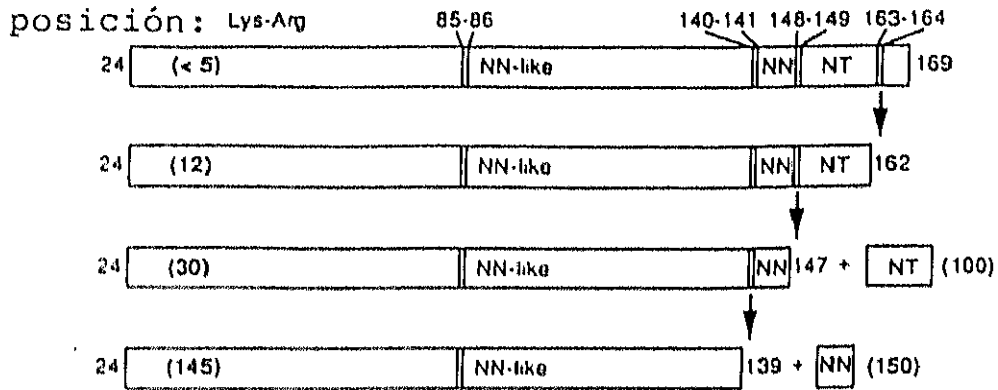


FIGURA 1: Representación esquemática de los sitios de hidrólisis y productos elaborados a partir del precursor NT/neuromedina N. Las flechas indican los dobletes Lys-Arg en donde se produce el procesamiento (modificado de Kitabgi et al., 1992).

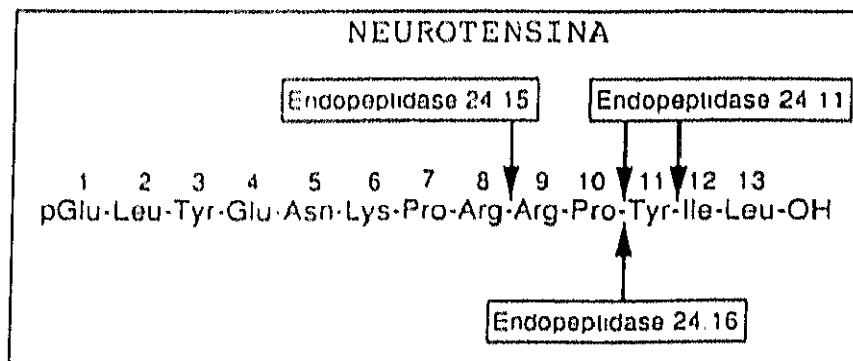


FIGURA 2: Mecanismo de inactivación de la NT por medio de peptidasas. Las flechas indican los enlaces peptídicos que rompen las peptidasas (modificado de Kitabgi et al., 1992).

2.2 Almacenamiento, liberación e inactivación de la NT

Una vez sintetizada la NT se almacena en vesículas sinápticas y se libera de forma Ca^{2+} -dependiente tras una despolarización inducida por K^+ (Iversen et al., 1978; Kitabgi et al., 1990). La inactivación de la NT se produce mediante su degradación en la hendidura sináptica a través de las peptidasas tal y como hemos visto anteriormente (Kitabgi et al., 1992).

2.3 Receptores de NT

Mediante el uso de ligandos iodados o tritiados de NT, se ha descrito la presencia de dos subtipos de receptores para NT, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. Los receptores de alta afinidad están asociados a neuronas y los de baja afinidad a células gliales (Schotte et al., 1988). Aunque se conoce poco sobre la estructura del receptor de NT de alta afinidad se sabe que pertenece a la familia de receptores ligados a proteínas G de membrana (Tanaka et al., 1990). La unión de NT a su receptor produce tres efectos principalmente: un aumento de GMPc, un aumento de inositoltrifosfato y una disminución de AMPc (Bozou et al., 1989; Vicent, 1992).

En cuanto a la distribución de los receptores neurotensinérgicos en el SNC de la rata, las regiones donde existe una mayor densidad son: la capa externa del bulbo olfatorio, surco rinal, amígdala, sustancia negra y área tegmental ventral (Sadoul et al., 1984).

2.4 Distribución y vías neurotensinérgicas

La distribución de NT en el SNC es bastante heterogénea. En un estudio realizado recientemente en cerebro de rata se muestra que existen concentraciones altas de NT en hipotálamo, amígdala, área tegmental ventral globus pallidus, sustancia negra y sustancia gris periacueductal; moderadas en septum, hipocampo y accumbens y concentraciones menores en estriado y corteza cerebral (Kitabgi et al., 1992).

En cuanto a las vías mediadas por NT, se han descrito las siguientes (tabla 1): una que va desde el área tegmental ventral hasta el núcleo accumbens (Kalivas y Miller, 1984) y CP (Studler et al., 1988); otra que proyecta desde el núcleo central de la amígdala a la capa nuclear de la estria terminal (Uhl y Snyder, 1977), y una última vía que va desde el subiculum hasta el alveus, fimbria, fórnix y cuerpos mamilares (Sakamoto et al., 1986).

ORIGIN	PROYECCION
AVT	Núcleo accumbens Corteza prefrontal
Núcleo central de la amígdala	Capa nuclear de la estria terminal
Subiculum	Alveus Fimbria Fórnix Cuerpos mamilares

TABLA 1: Principales proyecciones neurotensinérgicas en el SNC de la rata (Uhl y Snyder, 1977; Kalivas y Miller, 1984; Sakamoto et al., 1986; Studler et al., 1988)

3.- DOPAMINA

La dopamina (DA) es un neurotransmisor ampliamente estudiado en el SNC. En un principio fue considerado un simple intermediario en la síntesis de adrenalina y noradrenalina, pero las altas concentraciones de DA en el cerebro hicieron suponer a Bertler y Rosengren (1959) su posible papel neurotransmisor. Hoy en día, se sabe que la DA es un neurotransmisor que participa en una serie de mecanismos encefálicos entre los que destacan funciones como la locomoción, motivación y emoción (Bradford, 1988).

3.1 Metabolismo de la DA

La DA se sintetiza en el citosol de las neuronas a partir de la tirosina y por la acción de las enzimas tirosina hidroxilasa (TH) y dopa decarboxilasa (DDC). La tirosina puede sintetizarse a partir de la fenilalanina o provenir de la dieta, y penetrar en la neurona por transporte activo (Flórez et al., 1988). La enzima TH cataliza el paso limitante en la síntesis de catecolaminas. Se encuentra en el citosol de las neuronas catecolaminérgicas y requiere O_2 , Fe^{2+} y el cofactor tetrahidropterina (fig. 3).

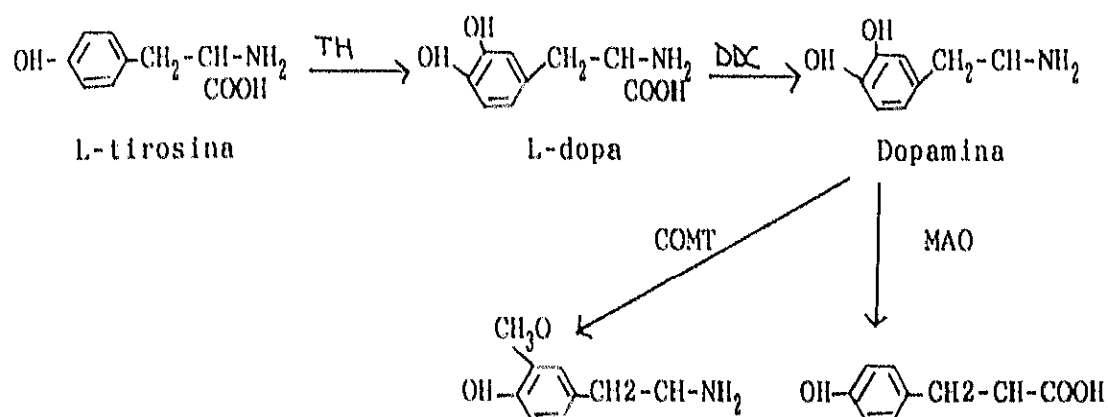


FIGURA 3: Síntesis y degradación enzimática de la DA.

La degradación de la DA se lleva a cabo por medio de dos enzimas: la monoaminoxidasa (MAO), y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). La MAO es una enzima intracelular que se encuentra en la cara externa de las mitocondrias, tanto en el SNC como en órganos periféricos (hígado, riñón, intestino). En el SNC se encarga de degradar la DA que hay libre en el citosol de la neurona. La COMT es una enzima extraneuronal que se encuentra ampliamente distribuida por todo el organismo. En el SNC degrada la DA presente en la hendidura sináptica (Bradford, 1988)

3.2 Almacenamiento, liberación e inactivación de la DA

Prácticamente la totalidad de la DA sintetizada en el citosol es recaptada y almacenada en vesículas, mientras que sólo una pequeña cantidad queda libre en el citoplasma. La recaptación vesicular se produce por medio de un transportador acoplado a un gradiente de H^+ que es mantenido por una ATPasa dependiente de Mg^{2+} (Seiden et al., 1993).

La DA vesicular se libera de forma Ca^{2+} -dependiente tras una despolarización de la membrana. Existe también una liberación de la DA citoplasmática, que es Ca^{2+} -independiente, y se produce por reversión del transportador encargado de la recaptación de DA (Seiden et al., 1993).

La DA presente en la hendidura sináptica puede inactivarse bien por la COMT o por recaptación. La recaptación de DA por las neuronas se produce por medio de un transportador de alta afinidad, dependiente de Na^+ y de Cl^- (Seiden et al., 1993; Amara y Kuhar, 1993).

3.3 Receptores de DA

Hacia los años 70 se demostró la existencia de dos tipos de receptores dopaminérgicos, los D1 y los D2. Los receptores D1 están asociados positivamente a la adenilato-ciclasa, de manera que su activación produce un aumento del AMPc. Los receptores D2 pueden estar asociados negativamente a la adenilato-ciclasa, o pueden estar asociados a otros sistemas de traducción (Sibley y Monsma, 1992). Recientes estudios de clonación han mostrado que los receptores D1 y D2 son familias de receptores. La familia de los D1 está formada por los receptores D1A, D1B (también llamados D1 y D5 respectivamente); la familia de los D2 está formada por los receptores D2A-S/D2A-L, D2B y D2C (también llamados D2S/D2L, D3 y D4 respectivamente) (Sibley y Monsma, 1992). Las características principales de estos receptores así como su localización en el SNC se recogen en la tabla 2

Nomenclatura	D1	D5	D2S/D2L	D3	D4
Nomenclatura alternativa	D1A	D1B	D2A-S/D2A-L	D2B	D2C
Agonistas selectivos	SFK38393 fenoldopam	• D1	N-0437 bromocriptina	• D2S/D2L	• D2S/D2L
Antagonistas selectivos	SCH23390 SKF83566	• D1	sulpiride YM091512	• D2S/D2L	clozapina
Respuesta celular	I AMPc	I AMPc	I AMPc I permeabilidad Ca ²⁺ , K ⁺	I AMPc (?)	I AMPc (?)
Localización en SNC	estriado accumbens tubérculo olfatorio	hipocampo hipotálamo	estriado accumbens tubérculo olfatorio	tubérculo olfatorio hipotálamo accumbens	corteza frontal médula espinal mesencéfalo

TABLA 2: Características generales y distribución de los receptores dopaminérgicos en el SNC (Sibley y Monsma, 1992; Mora y Sanguinetti; 1994 receptor and ion channel nomenclature supplement).

3.4 Distribución y vías dopaminérgicas

La primera definición anatómica del sistema catecolaminérgico fue realizada por Dahlstrom y Fuxe en el año 1964. Dichos autores utilizaron técnicas de histofluorescencia que no permitieron diferenciar el sistema dopaminérgico del resto de los sistemas catecolaminérgicos. Posteriores estudios basados en el marcaje de enzimas específicas de las neuronas adrenérgicas y noradrérgicas, concretamente el marcaje de la enzima dopamina-β-hidroxilasa, permitieron diferenciar el sistema dopaminérgico del resto de los catecolaminérgicos (Kalsbeek, 1989).

En base al origen y a la zona a la cual proyectan, Bjorklund y Lindvall (1984) definieron diferentes sistemas dopaminérgicos en el SNC de la rata (tabla 3; fig. 4). El sistema principal lo constituye el sistema dopaminérgico mesencefálico que tiene su origen en las áreas A8-A10. Las

proyecciones más importantes de este sistema son la nigroestriatal mesolímbica y mesocortical. La DA también está presente en células amacrinas de la retina, y en órganos periféricos tales como: ganglios simpáticos, ganglios viscerales, médula adrenal y paredes de las arterias mesentéricas y renales (Bradford, 1988; Kalsbeek, 1989).

SISTEMA	ORIGEN	PROYECCION
Sistema meso-estriatal	sustancia negra AVT n. retrorubal	áreas estriatales
Sistema meso-limbocortical	AVT sustancia negra n. tetrarubal	áreas límbicas y corticales
Sistema diencéfalo-espinal	hipotálamo dorsal y posterior zona incierta tálamo caudal	médula espinal
Sistema incierto-hipotalámico	zona incierta hipotálamo periventricular	área preóptica hipotálamo periventricular
Sistema periventricular	sustancia gris periaqueductal sustancia gris periventricular del hipotálamo caudal	sustancia gris periaqueductal tálamo medial hipotálamo medial
Sistema tubero-hipofisial	n. arcuato n. periventricular	eminencia media pituitaria
Neuronas periglomerulares	bulbo olfatorio	dendritas del glomérulo olfatorio

TABLA 3: Principales sistemas de proyección dopaminérgicos en el SNC de la rata (modificado de Bjorklund y Lindvall, 1984)

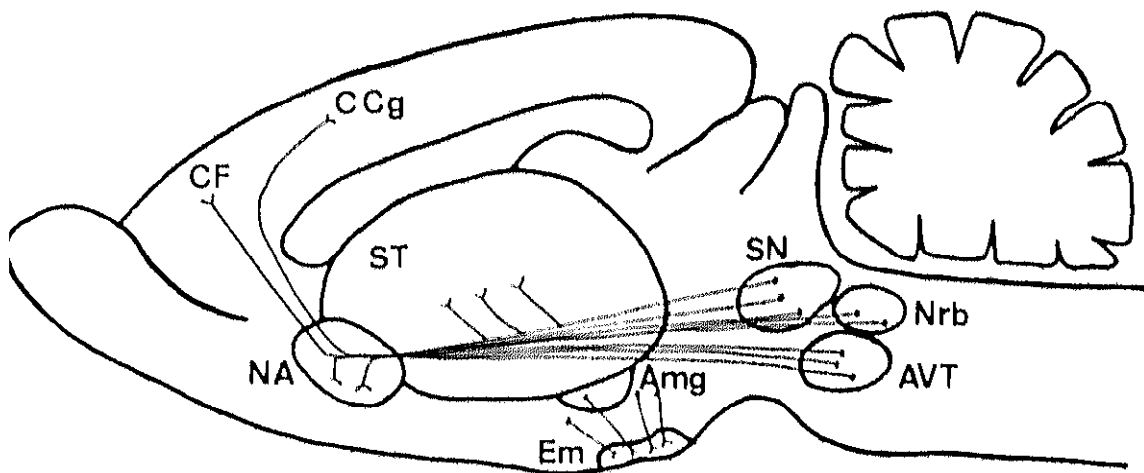


FIGURA 4: Esquema de las principales proyecciones dopaminérgicas que existen en el cerebro de la rata (modificado de Cooper et al., 1982)

4.- ACETILCOLINA

La acetilcolina (ACh) fué la primera sustancia identificada como un posible transmisor intercelular por Hunt en el año 1907. Estudios realizados por Dale en 1914 mostraron como la ACh mimetizaba la respuesta de la estimulación nerviosa parasimpática (Dale, 1914). Estudios posteriores (Loewi, 1921), indicaron que la ACh es liberada tras la estimulación nerviosa. Durante las dos últimas décadas se ha acumulado una gran cantidad de información donde se pone de manifiesto la relación del sistema colinérgico, en particular del sistema colinérgico telencefálico, con funciones superiores del cerebro como son la atención, el aprendizaje y la memoria (Vidal y Changeaux, 1993).

4.1 Metabolismo de la ACh

En el SNC de los mamíferos la ACh se sintetiza mayoritariamente a partir de colina y de acetyl coenzima A, mediante la acción de la enzima colina acetyl transferasa (ChAT) (fig. 5). Dicha reacción tiene lugar principalmente en el citoplasma de las terminales colinérgicas, es una reacción reversible y en condiciones de reposo se encuentra fuertemente desplazada hacia la síntesis de ACh (Tucek, 1985; 1993)

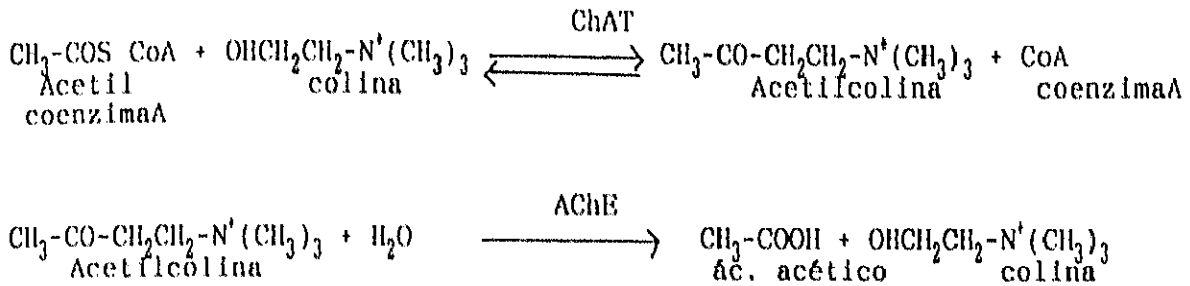


FIGURA 5: Esquema de síntesis y degradación de la ACh.

La síntesis del Acetil CoA tiene lugar en la mitocondria siendo el piruvato el origen más próximo del grupo acetilo, en el SNC. En cuanto a la colina, en el SNC proviene de la degradación de la ACh en la hendidura sináptica (Tucek, 1985).

El catabolismo de la ACh se produce mediante su hidrólisis en la hendidura sináptica por medio de la enzima colina acetil esterasa (ChAE) que hidroliza la ACh para dar lugar a colina y acetato. Dicha enzima no es específica de la neuronas colinérgicas (Tucek, 1985).

4.2 Almacenamiento, liberación e inactivación de la ACh

Una vez sintetizada, la ACh puede encontrarse libre en el citoplasma o almacenarse en vesículas sinápticas. Existen dos poblaciones de vesículas sinápticas, unas de almacenamiento, y otras de liberación, entre las cuales existe un equilibrio dinámico. La recaptación de la ACh vesicular se produce por medio de un transportador acoplado a un gradiente de H⁺ que es mantenido por una ATPasa (Tucek, 1985).

Cuando un potencial de acción despolariza la terminal colinérgica, las vesículas más cercanas a la membrana, liberan ACh de forma Ca^{2+} -dependiente. Una vez vacías, las vesículas son rápidamente recicladas y reincorporan ACh citoplasmática. Si la célula está en reposo aumentan su carga y su presión osmótica hasta adquirir la configuración de vesículas de almacenamiento (Whittaker, 1986). Existe también una liberación espontánea de ACh citoplasmática que es independiente de Ca^{2+} y tiene lugar tanto en reposo como bajo estimulación, y cuya intensidad es constante (Tucek, 1985).

La inactivación de la ACh, se produce mediante su hidrólisis en la hendidura sináptica por la enzima ChAE, tal y como se ha visto anteriormente. La colina resultante es recaptada, principalmente, mediante un transportador de alta afinidad. Dicho transportador es dependiente de Na^+ y de Cl^- y en el SNC se localiza específicamente en las terminales y en los axones de las neuronas colinérgicas (Tucek, 1985; Kandel y Schwartz, 1985).

4.3 Receptores de la ACh

Los receptores acetilcolinérgicos se clasifican en receptores nicotínicos y receptores muscarínicos. Inicialmente se hizo esta distinción por métodos empíricos farmacológicos: ciertas respuestas a la ACh, como las provocadas por la excitación de fibras preganglionares simpáticas y parasimpáticas, así como las del potencial de la placa motriz, eran imitadas específicamente por la nicotina y bloqueadas por la tubocurarina; mientras que las repuestas producidas por la excitación de fibras postganglionares parasimpáticas eran imitadas por la muscarina y bloqueadas por la atropina. Esta diferenciación farmacológica se vió confirmada por estudios de

fijación que demostraron la especificidad de un sitio de carácter muscarínico y otro de carácter nicotínico (Flórez et al., 1988)

Receptores nicotínicos

El receptor nicotínico está asociado directa y permanentemente a canales iónicos. La activación del receptor produce un aumento de la permeabilidad a los iones Na^+ y K^+ y en menor grado al Ca^{2+} y Mg^{2+} . La respuesta a la activación nicotínica se caracteriza por su iniciación rápida y su duración corta (Flórez et al., 1988).

Las sinapsis nicotínicas, que media la ACh en el SNC, son de 10 a 100 veces menos frecuente que las sinapsis muscarínicas (Bradford, 1988).

Receptores muscarínicos

Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de receptores ligados a proteínas G. La diferente afinidad que presentan los receptores muscarínicos por la pirenzepina (PZ) hizo que un principio se clasificasen en receptores M1 y M2. Los receptores M1 se definieron como aquellos que presentan una alta afinidad por la PZ y están localizados en el SNC y los receptores M2 como aquellos que presentan una afinidad baja por la PZ y se localizan principalmente en órganos periféricos (Bonner, 1989).

Actualmente estudios de clonación, han demostrado la existencia de 5 genes, que codifican 5 subtipos de receptores muscarínicos y se identifican como m1, m2, m3, m4 y m5. Los cuatro primeros se han caracterizado

farmacológicamente y se conocen bajo el nombre de receptores M1, M2, M3 y M4. El último subgrupo genético está todavía por caracterizar farmacológicamente (Bonner, 1989). Los receptores M1 y M3 actúan a través del metabolismo de los fosfolípidos de inositol y de la acumulación del AMPc; la activación de los receptores M2 y M4 inhiben la enzima adenilato ciclasa y por tanto disminuye la formación de AMPc (Bonner, 1989). Las características principales de estos receptores así como su localización se recogen en la tabla 4.

Nomenclatura	M1	M2	M3	M4
Agonistas selectivos	?	?	?	?
Antagonistas selectivos	pírenzepina telencepina	methoctramina APDX116	hexahydrosila- difenol p-fluorohexa- hydroxiladifedinaol	tropicamida
Respuesta celular	IP3/DG	I AMPc I permeabilidad K ⁺	IP3/DG	I AMPc
Localización en SNC	hipocampo corteza estriado	septum región pontina	corteza estriado hipocampo tálamo mesencéfalo	hipocampo corteza estriado

TABLA 4: Características generales y distribución de los receptores muscarínicos (modificado de Vilara et al., 1989; Bonner, 1989; 1994 *receptor and ion channel nomenclature supplement*).

4.4 Distribución y vías acetilcolinérgicas

Los primeros estudios acerca de la distribución de neuronas acetilcolinérgicas fueron los trabajos realizados por Lewis y Shute en 1967; dichos trabajos están basados en la localización inmunohistoquímica de la enzima AChE. Ahora bien, estos estudios con el tiempo fueron superados, ya que dicha enzima no es un marcador específico de las neuronas acetilcolinérgicas (Shute y Lewis, 1967). Los mapas anatómicos que en la actualidad definen el sistema acetilcolinérgico están basados en el marcaje de la ChAT, enzima específica de las neuronas acetilcolinérgicas (Cuello y Sofroniew, 1984; Sofroniew et al., 1985).

En el SNC de la rata, las vías de proyección acetilcolinérgicas, así como las neuronas intrínsecas, han sido ampliamente estudiadas por Sofroniew et al., (1985); estos estudios muestran que las neuronas positivas a ChAT se encuentran ampliamente distribuidas en todo el SNC, con excepción de áreas discretas como es el cerebelo. Dentro del sistema acetilcolinérgico, cabe destacar el sistema colinérgico telencefálico; dicho sistema parte de una banda de neuronas que se extiende desde el núcleo septal medial a los núcleos basales de Meynert a través de la banda diagonal de Broca, y proyecta a la corteza cerebral, amígdala, hipocampo y bulbo olfatorio. En la tabla 5 y fig. 6 quedan recogidas en un esquema las principales proyecciones y neuronas intrínsecas acetilcolinérgicas que existen en el cerebro de la rata (Sofroniew et al., 1985).

ORIGEN	PROYECCION
núcleos basales de Meynert	amígdala corteza cerebral
núcleo de la banda diagonal	bulbo olfatorio núcleo interpeduncular
núcleo de la habenúla medial	núcleo interpeduncular
núcleo tegmental pedunculopontino núcleo tegmental laterodorsal	tálamo

TABLA 5: Principales proyecciones acetilcolinérgicas en el SNC de la rata (Cuello y Sofroniew, 1984; Sofroniew et al., 1985)

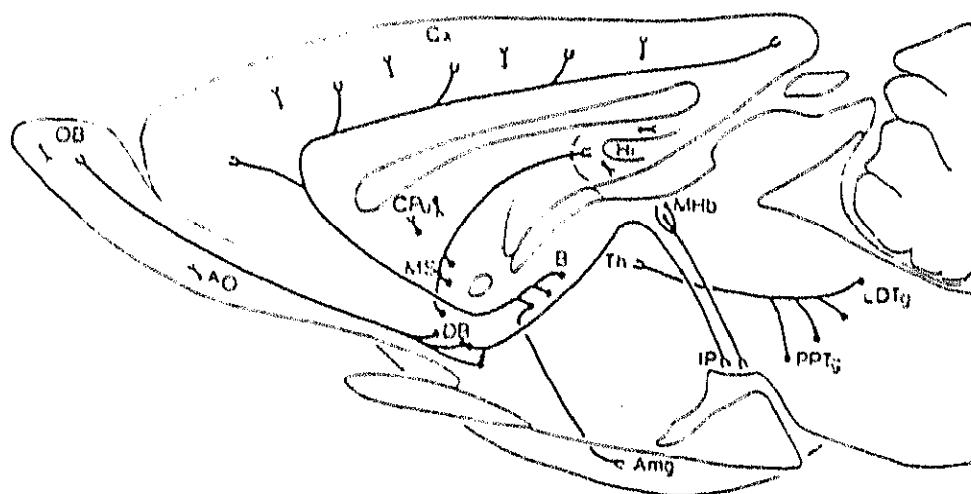


FIGURA 6: Esquema de las principales proyecciones y neuronas intrínsecas acetil colinérgicas que existen en el cerebro de la rata (Cuello y Sofroniew, 1984). Abreviaturas: Amg, amígdala; AO, n. olfatorio anterior; B, núcleo basal de Meynert; Cx, corteza cerebral; CPu, caudado-putamen; DB, n. de la banda diagonal; H, hipocampo; IP, n.interpeduncular; LDTg, n. tegmental laterodorsal; MHb, habenúla medial; OB, bulbo olfatorio; OT, tubérculo olfatorio; S, septum; PPTg, n. tegmental pedunculopontino y Th, tálamo.

5.- AMINOACIDOS NEUROTRANSMISORES

5.1 - Acido glutámico

Desde la década de los 50, en que se demostró la acción excitadora del ácido glutámico (GLU) en neuronas del SNC (Curtis et al., 1959), han sido muchos los trabajos dedicados a estudiar el papel neurotransmisor del GLU. A diferencia de otros neurotransmisores, tales como ACh o catecolaminas el GLU se encuentra, en el SNC, cumpliendo numerosas funciones de carácter estructural y metabólico.

Hoy en día parece bien argumentado que el GLU es el neurotransmisor que media la mayoría de las sinapsis excitadoras de la corteza cerebral (Fonnum, 1984; Cotman et al., 1987; Greenamyre y Young, 1989). En los últimos años este aminoácido ha recibido una atención especial debido, principalmente, al potencial efecto neurotóxico que posee y a su posible implicación en enfermedades neurodegenerativas tales como las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington (Plaitakis et al., 1982; Beal et al., 1986; Maragos et al., 1987).

5.1.1. Metabolismo del GLU

Las rutas de síntesis del GLU en el SNC son múltiples (glutamina, 2-oxoglutarato, arginina, prolina, ornitina, proteínas tisulares) pero los

precursores mayoritarios del GLU neurotransmisor son el 2-oxoglutarato y principalmente la glutamina (GLN) (ver fig. 7). El 2-oxo-glutarato es un intermediario del ciclo de Krebs y sintetiza GLU bien por medio de la enzima aspartato-amino-transferasa o por medio de la glutamato deshidrogenasa. La GLN es el principal precursor del GLU; el paso de GLN a GLU está catalizado por la enzima glutaminasa, cuya localización es principalmente neuronal (Hamberger et al., 1979; Bradford et al., 1978). El control de esta enzima se lleva a cabo mediante inhibición por su producto, así mismo puede ser activada por fosfatos y por Ca^{2+} (Bradford y Ward, 1976; Martínez-Hernández et al., 1977; Bradford et al., 1978).

La mayor parte del GLU es catabolizado en el interior del astrocito. Una vez que el GLU se encuentra en el citoplasma astrocitario, puede oxidarse en el ciclo de Krebs o convertirse en GLN por medio de la glutamina sintetasa, enzima que se encuentra localizada casi exclusivamente en las células gliales (Mártinez-Hernández et al., 1977). La GLN resultante es liberada al espacio extracelular y es recaptada por las terminales presinápticas de forma Na^{+} -independiente, donde es nuevamente convertida en GLU por acción de la glutaminasa. Existe, por tanto, un ciclo de transferencia GLU-GLN entre la terminal presináptica neuronal y las células gliales (Bachelard, 1981).

5.1.2 Almacenamiento, liberación e inactivación del GLU

El GLU, en las terminales sinápticas, puede estar libre en el citoplasma o almacenado en vesículas. Las vesículas sinápticas cerebrales captan GLU del citoplasma por un transportador acoplado a un gradiente de

H⁺ que es mantenido por una ATPasa dependiente de Mg²⁺ (Naito y Ueda, 1985) (ver fig. 7). En el citoplasma de las terminales sinápticas existen altas concentraciones de GLU que se consideran una reserva que permiten el relleno de las vesículas (Fonnum, 1991).

La liberación del GLU vesicular, tiene lugar de forma Ca²⁺ dependiente. Existe también una liberación del GLU citoplasmático Ca²⁺ independiente y que se produce por reversión del transportador encargado de la recaptación del GLU (Fonnum, 1984; Nicholls y Attwell, 1990; Nicholls, 1993).

Una vez liberado en las sinapsis, la inactivación del GLU se lleva a cabo fundamentalmente a través de sistemas de recaptación de alta afinidad Na⁺-dependientes. Dichos transportadores están situados en las membranas tanto de las neuronas como de las células gliales (Fonnum, 1984; Nicholls, 1989, 1993; Gundersen et al., 1993). En astrocitos se ha descrito un sistema transportador para GLU, que no ha sido descrito en neuronas. Este sistema es Cl⁻-dependiente y difiere de los sistemas Na⁺-dependientes no sólo en sus requerimientos iónicos, sino también en su farmacología y en su distribución anatómica (Anderson et al., 1990).

Los sistemas de recaptación de GLU y su alta afinidad son de gran importancia dado el potencial papel excitotóxico que presentan las altas concentraciones de GLU (Anderson et al., 1990).

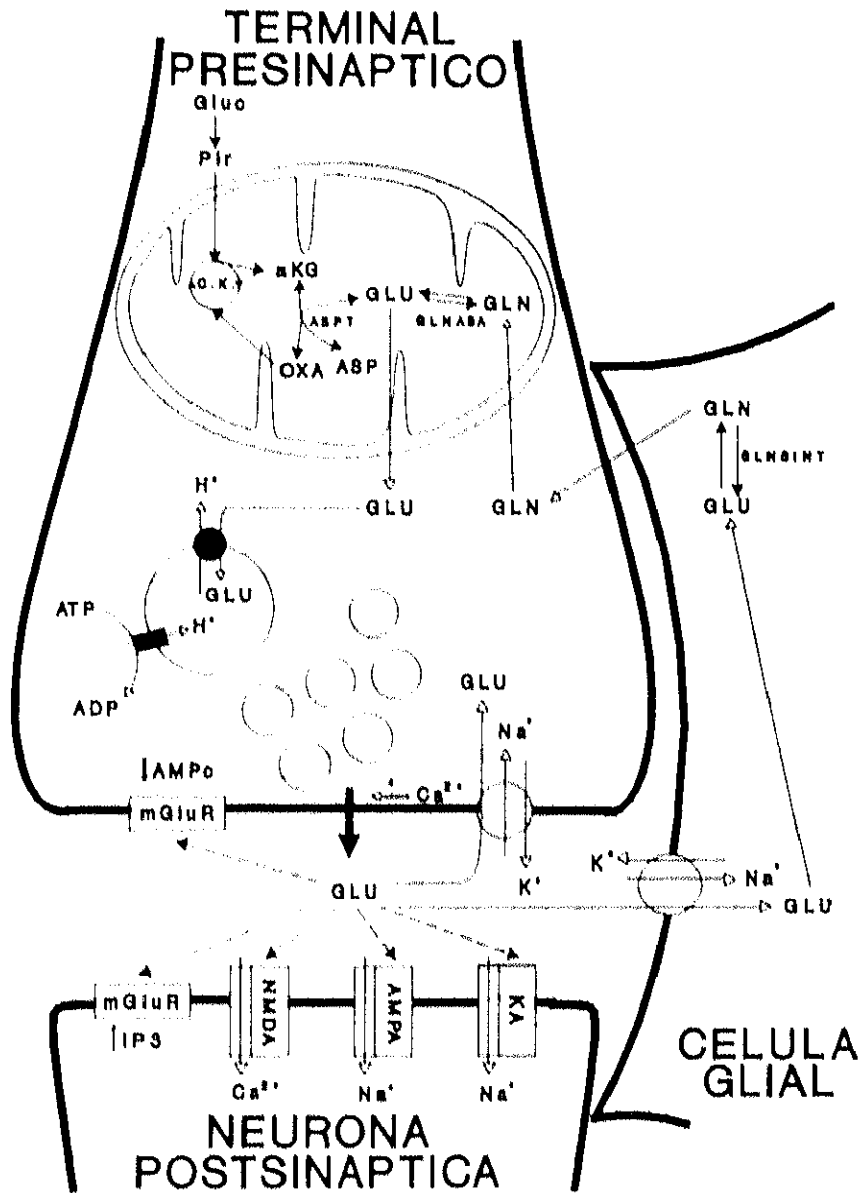


FIGURA 7: Esquema de los procesos relacionados con la transmisión glutamatérgica. α Kg: α -cetoglutarato; AMPA: receptor AMPA; ASP: aspartato; ASPT: aspartato aminotransferasa; C.K.: ciclo de Krebs; GLN: glutamina; GLNASA: glutaminasa; GLNSINT: glutamina sintetasa; GLU: glutamato; Gluc: glucosa; KA: receptor kainato; mGluR: receptor metabotrópico; NMDA: receptor NMDA; OXA: oxalacetato; Pir: piruvato (Segovia, 1995).

5.1.3. Receptores del GLU

Estudios farmacológicos con sustancias análogas al GLU han permitido deducir la existencia de dos clases de receptores glutamatérgicos, los receptores ionotrópicos (iGluRs) y los receptores metabotrópicos (mGluRs) (Zukin et al., 1991; Nakanishi, 1992).

Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

Los iGluRs están asociados a canales iónicos, su activación aumenta la permeabilidad de la membrana a diferentes iones (Nakanishi, 1992; Seegurg, 1993). A este grupo pertenecen los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropanato (AMPA) y kainato (KA) (Seegurg, 1993) (ver fig. 7). AMPA y KA están implicados en la transmisión de la señal excitadora rápida. NMDA está asociado a la transmisión de la señal excitadora lenta, es voltaje dependiente y para su activación necesita una previa despolarización de la membrana, de aquí que esté asociado a otros receptores, generalmente al receptor AMPA (Cotman et al., 1987; Raymond et al., 1993; Nicholls, 1993). Las principales características de estos receptores se recogen en la tabla 6.

Nomenclatura	NMDA	AMPA	KA
Agonistas selectivos	NMDA glicina	AMPA	kainato domoato
Antagonistas selectivos	D-AP5 CGS19755	NBQX GYKI52466	kinurenato AMOA
Respuesta celular	↑ permeabilidad Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	↑ permeabilidad Na ⁺ , K ⁺	↑ permeabilidad Na ⁺ , K ⁺
Localización en SNC	hipocampo (stratum radiatum) estriado tálamo corteza cerebelo (capa granular)	receptor NMDA cerebelo (capa molecular)	complementaria a receptor NMDA hipocampo (stratum lucidum) hipotálamo

TABLA 6: Características generales y distribución de los receptores glutamatérgicos (Colman et al., 1987; Watkins et al., 1990; Farooqui y Horrocks, 1991; Seeburg, 1993; Sprengel y Seeburg, 1993; Schoepp y Conn, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994; Mora y Sanguinetti, 1994; 1994 receptor and ion channel nomenclature supplement).

Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

Los mGluRs son una familia de receptores que se encuentran asociados a proteínas G. Existen 6 subtipos de mGluRs los cuales se incluyen en tres grupos según la similitud de su secuencia (Nakanishi, 1992). La activación de los mGluRs está acoplada a la activación de múltiples sistemas de segundos mensajeros, pudiéndose producir: aumento de los fosfoinositoles; aumento o disminución de AMPc; activación de la fosfolipasa D y modulación de canales iónicos (Schoepp y Conn, 1993). En general los mGluRs parecen tener un efecto modulador de la transmisión sináptica. La activación de estos receptores, en función de los efectores celulares a los que estén acoplados, pueden producir efectos excitadores o inhibidores. Un efecto constante en todo el cerebro es que la activación de estos receptores produce una reducción de la transmisión en las sinapsis excitadoras glutamatérgicas. Este efecto se piensa que pudiese estar mediado por un autoreceptor presináptico, concretamente se piensa que está mediado por el receptor mGluR4, el cual ha sido clásicamente considerado como un tipo diferente de receptor glutamatérgico, el receptor 2-amino-4-fosfobutirato (AP4) (Schoepp y Conn, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994). Las principales características de estos receptores, así como su distribución en el SNC de la rata se recogen en la tabla 7.

Grupo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Nomenclatura	mGluR1, mGluR5	mGluR2, mGluR3	mGluR4, mGluR6
Agonistas selectivos	tACPD	tACPD	tACPD AP4
Antagonistas selectivos	L-AP3	?	?
Respuesta celular	↑ IP3/DG	↓ AMPc	↓ AMPc
Localización en SNC	hipocampo cerebelo (neuronas de Purkinje)	cerebelo (neuronas de Golgi)	hipocampo retina

TABLA 7: Características generales y distribución de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (Nakanishi, 1992; Hollman y Heinemann, 1994; 1994 receptor and ion channel nomenclature supplement)

5.1.4 Distribución y vías glutamatérgicas

El sistema glutamatérgico se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, concretamente en el telencéfalo en donde la mayoría de las proyecciones corticales parecen estar mediadas por GLU. Una de las primeras vías en las que se describió el papel neurotransmisor del GLU fue en la proyección que va desde la corteza motora y premotora a caudado-putamen (Spencer, 1976). La confirmación de la naturaleza glutamatérgica de esta vía se realizó desde múltiples aproximaciones metodológicas (McGeer et al., 1977; Fonnum et al., 1981b; Hassler et al., 1982; Peinado y Mora, 1986). En la tabla 8, fig. 8 se recogen las principales proyecciones glutamatérgicas en el SNC de la rata.

ORIGEN	PROYECCION
coclea (nervio auditivo)	núcleo coclear
capa granular cerebelo (fibras paralelas)	capa molecular cerebelo
oliva inferior (fibras trepadoras)	neuronas de Purkinje
corteza	estriado tálamo substantia nigra médula espinal hipocampo (vía perforante) corteza contralateral
hipocampo	hipotálamo septum lateral hipocampo contralateral
giro dentado (fibras musgosas)	región inferior del hipocampo
CA3 (colaterales de Schaffer)	región superior del hipocampo
tálamo	corteza frontal
bulbo olfatorio	corteza olfatoria
aferencias sensitivas primarias	médula espinal

TABLA 8: Algunas vías glutamatérgicas propuestas (Fagg y Foster, 1983; Fonnum, 1984; Cotman et al., 1987; Robinson y Coyle, 1987).

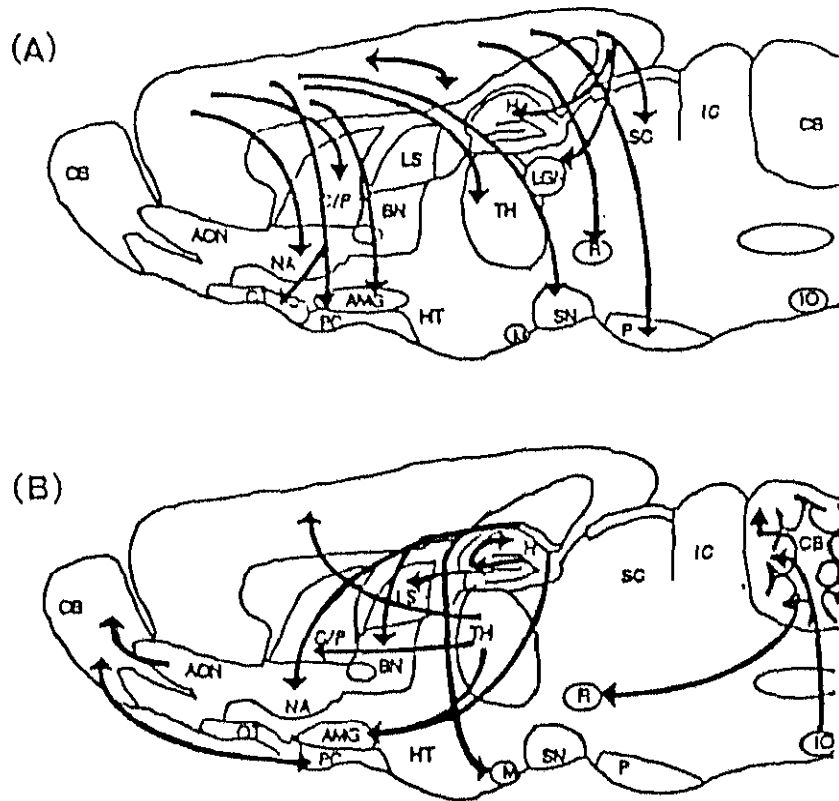


FIGURA 8: Representación esquemática de algunas vías del SNC de la rata mediadas por GLU. a) vías córtico fugales. b) vías subcorticales. Abreviaturas: OB, bulbo olfatorio; AON, bulbo olfatorio anterior; NA, n. accumbens; OT, tubérculo olfatorio; AMG, amígdala; PC, corteza piriforme; C/P, caudado-putamen; LS, septum lateral, NS, sustancia negra; R, n. rojo; SC, colículo superior; IC, colículo inferior; P, n. pontinos; CB, cerebelo; IO, complejo olivar inferior (Cotman et al., 1987).

5.2 GABA

El ácido Γ -amino-butírico (GABA) es uno de los neurotransmisores mejor estudiados del SNC. Robert y Awapara descubrieron independientemente en el año 1950 la presencia de GABA en el cerebro (Roberts y Frankel, 1950; Awapara et al., 1950), pero hasta finales de los años 60 no se estableció su papel como neurotransmisor (Krujevic y Schwartz, 1966; Obata y Takeda, 1969). Hoy en día, se considera el neurotransmisor inhibitor más extendido en el SNC de los mamíferos. Su concentración es entre 200 y 1000 veces superior a la de otros neurotransmisores tales como DA y ACh (McGeer y McGeer, 1989).

5.2.1 Metabolismo

En el cerebro adulto de los mamíferos el GABA se sintetiza principalmente a partir del GLU por acción de la enzima GABA-decarboxilasa (GAD) (ver fig.9). Dicha reacción es irreversible en condiciones fisiológicas. GAD es una enzima citoplasmática específica de las neuronas gabérgicas, por lo cual es usada como marcador químico. Necesita la presencia del coenzima piridoxal-5-fosfato y es inhibida competitivamente por GABA, ácido aspártico y Cl^- (Martín, 1993; Martín y Rimwall, 1993).

El metabolismo del GABA se produce por medio de la enzima GABA-

transaminasa (GABA-T). Esta enzima es mitocondrial, no específica de las neuronas gabérgicas y necesita como cofactor el coenzima piridoxal-5-fosfato. GABA-T a partir de α -cetoglutarato y GABA rinde GLU y semialdehído succínico. La disponibilidad de α -cetoglutarato es un factor importante en la regulación de la actividad de la enzima. Cuando dicha transaminación se produce en la glía, el GLU formado da lugar a GLN por acción de la enzima glutamina-sintetasa. La GLN es transportada a la terminal sináptica donde es transformada en GLU y éste a su vez en GABA (McGeer y McGeer, 1989; Martín, 1993; Martín y Rinvall, 1993) (ver fig. 10)

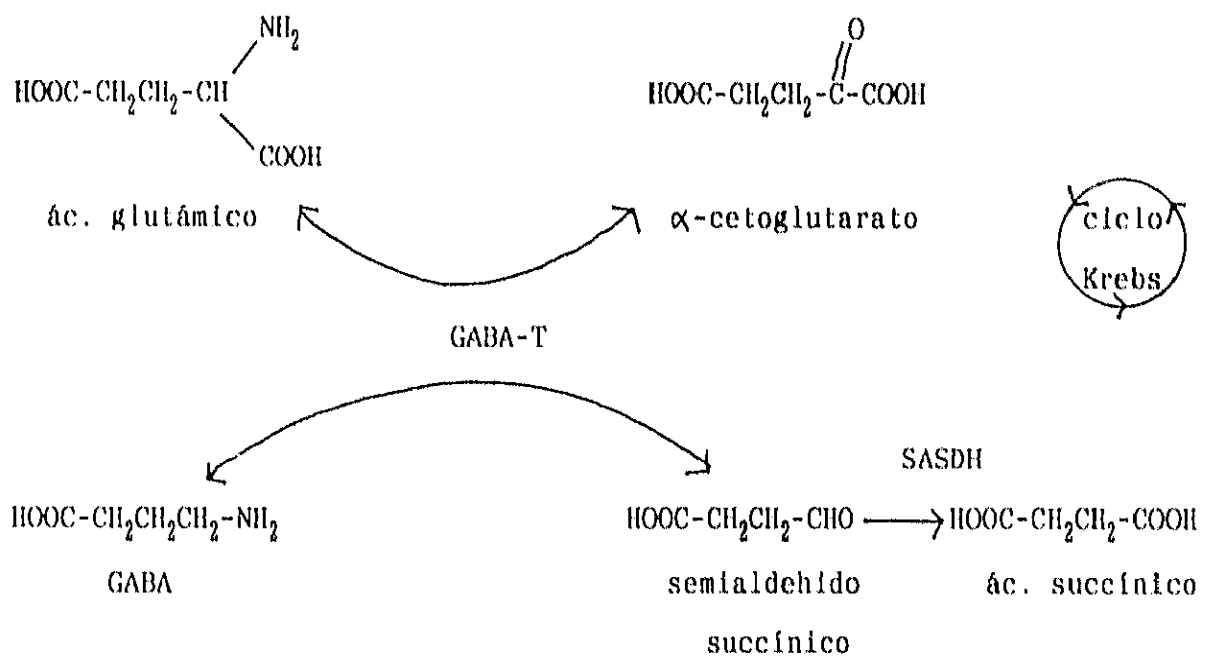


FIGURA 9: Síntesis y degradación enzimática de GABA

5.2.2 Almacenamiento, liberación e inactivación del GABA

El GABA puede encontrarse libre en el citoplasma o acumulado en vesículas. Las vesículas sinápticas acumulan GABA en su interior por medio de un transportador acoplado a un gradiente de H^+ que es mantenido por una ATPasa dependiente de Mg^{2+} (Fykse y Fonnum, 1988) (ver fig. 10)

La liberación de GABA vesicular tiene lugar de forma Ca^{2+} -dependiente. Trabajos recientes han mostrado que existe también una liberación de GABA citoplasmático que es Ca^{2+} -independiente y se produce por reversión del transportador encargado de la recaptación del GABA (Amara y Kuhar, 1993; Lester et al., 1994).

Una vez liberado en la hendidura sináptica la inactivación de GABA se lleva a cabo por medio de unos transportadores de alta afinidad dependientes de Na^+ y Cl^- situados, principalmente, en las membranas de las neuronas, aunque también existen en las células gliales (Lester et al., 1994). Se han identificado dos sistemas de transporte para GABA (Iversen y Kelly, 1975). Se propone que uno sea un transportador neuronal y otro glial, aunque algunos estudios contradicen esta hipótesis (Cummins et al., 1982; Larsson et al., 1986).

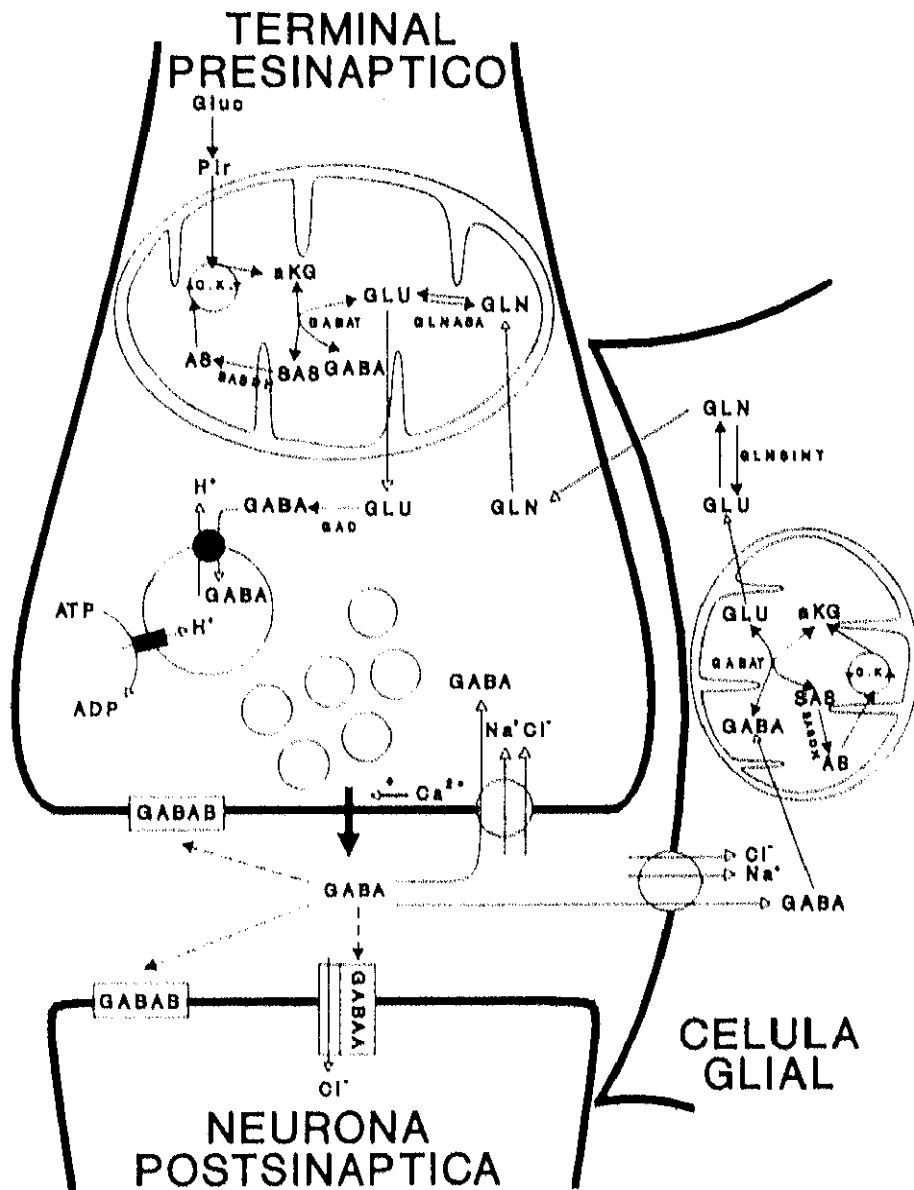


FIGURA 10: Esquema de los procesos relacionados con la transmisión gabérgica. α-KG: α-cetoglutarato; AS: ácido succínico; C.K.: ciclo de Krebs; GABA: ácido gamma-aminobutírico; GABA_A: receptor GABA_A; GABA_B: receptor GABA_B; GABA-T: GABA transaminasa; GAD: ácido glutámico decarboxilasa; GLN: glutamina; GLN-ASA: glutaminasa; GLN-SINT: glutamina sintetasa; GLU: glutamato; Gluc: glucosa; Pir: piruvato; SAS: semialdehído succínico; SASDH: semialdehído succínico deshidrogenasa (Segovia, 1995).

5.2.3 Receptores del GABA

Los receptores gabérgicos se pueden dividir en dos tipos, los GABA-A y GABA-B. Ambos tipos de receptores se encuentran en la mayoría de las regiones del SNC, aunque la densidad varía mucho de unas zonas a otras. En la tabla 9 se muestran las características principales de ambos receptores, así como su distribución en el SNC de la rata.

Receptor GABA-A

El receptor GABA-A es un receptor ionotrópico que está implicado en la transmisión de la señal inhibitora rápida mediante la apertura de canales de Cl^- (McGeer y McGeer, 1989; Bittiger et al., 1993) (ver fig. 10).

El receptor GABA-A posee sitios de unión específicos para GABA, barbitúricos, benzodiazepinas, anestésicos esteroideos y picrotoxina, de forma que las corrientes de Cl^- son reducidas por picrotoxina, bicuculina y penicilina G y son aumentadas por benzodiazepinas, barbitúricos y anestésicos esteroideos (McDonald y Olsen, 1994).

Receptor de GABA-B

El receptor de GABA-B está acoplado a proteínas G. La activación del receptor GABA-B inhibe la formación de AMPc, disminuye la permeabilidad al Ca^{2+} e incrementa la permeabilidad al K^+ . A nivel presináptico la activación

de los receptores GABA-B inhibe la liberación de neurotransmisores y a nivel postsináptico media potenciales postsinápticos inhibidores lentos (Bittiger et al., 1993).

Estudios bioquímicos realizados recientemente sugieren que el receptor GABA-B es heterogéneo y que existen distintos subtipos de receptores. Estos difieren entre sí en su localización, farmacología y en su efecto sobre la liberación de otros neurotransmisores. Hasta el momento no se han clonado los distintos subtipos de receptores GABA-B (Bonanno y Raiteri, 1993).

Nomenclatura	GABA-A	GABA-B
Agonistas selectivos	Muscimol Isoguvacina	Baclofen
Antagonistas selectivos	Bicuculina SR95531	Saclofen CGP35348
Respuesta celular	↑ permeabilidad Cl ⁻	↓ permeabilidad K ⁺ ↓ permeabilidad Ca ²⁺ ↓ AMPc
Localización en SNC	corteza frontal cerebelo (capa granular) bulbo olfatorio tálamo	n. interpeduncular cerebelo (capa molecular) corteza frontal n. olfatorio anterior tálamo

TABLA 9: Características principales y distribución de los receptores gabérgicos (Bowery et al., 1987; Bowery, 1993; McDonald y Olsen, 1994; 1994 receptor and ion channel nomenclature supplement)

5.2.4 Distribución y vías gabérgicas

El GABA es el neurotransmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el SNC. Las neuronas gabérgicas han sido consideradas clásicamente interneuronas, pero actualmente se conocen neuronas de proyección de naturaleza gabérgica. A pesar de que las interneuronas gabérgicas están prácticamente distribuidas en todo el cerebro, caben destacar zonas donde existen una gran densidad tales como: corteza cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio, hipotálamo y retina (Fagg y Foster, 1983; Mugnaini y Oertel, 1985). En cuanto a las neuronas de proyección, los ganglios basales son la región cerebral que presenta una mayor abundancia de proyecciones gabérgicas (Fagg y Foster, 1983; Mugnaini y Oertel, 1985; McGeer y McGeer, 1989). En la tabla 10, fig. 11 se recogen las principales proyecciones gabérgicas presentes en el SNC de la rata.

ORIGEN	PROYECCION
corteza	substantia nigra
hipocampo	hipocampo contralateral
núcleo accumbens	globus pallidus substantia nigra área tegmental ventral
estriado	globus pallidus núcleo entopeduncular substantia nigra
globus pallidus	núcleo subtalámico substantia nigra estriado
núcleo entopeduncular	habénula lateral tálamo
substantia nigra (parte reticulata)	tálamo colículo superior
neuronas de Purkinje	núcleos cerebelares núcleo vestibular lateral

TABLA 10: Algunas vías gabérgicas propuestas (Fagg y Foster, 1983; Mugnaini y Oertel, 1985; McGeer y McGeer, 1989).

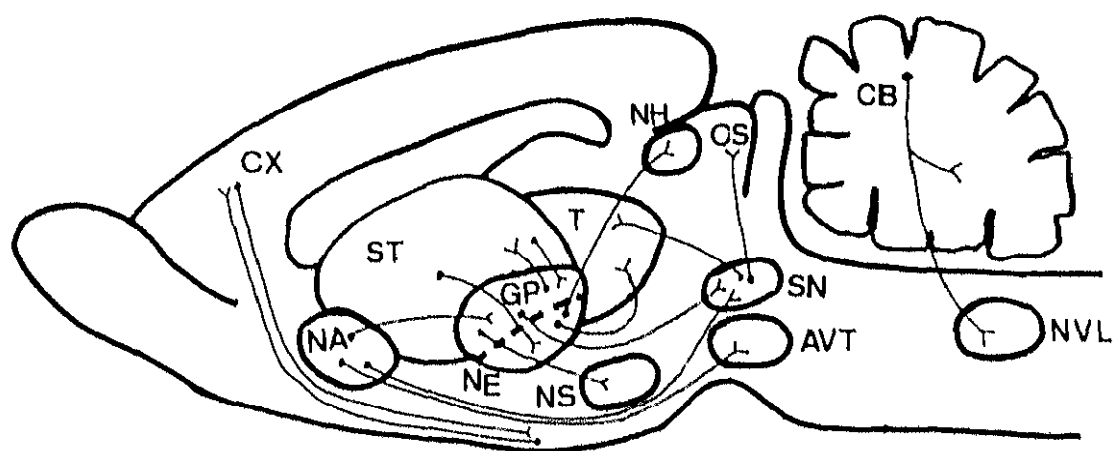


FIGURA 11: Representación esquemática de algunas vías del SNC de la rata que están mediadas por GABA. AVT, área tegmental ventral; CB, cerebelo; CS, colículo superior; CX, corteza cerebral; GP, globus pallidus; HT, hipotálamo; NA, núcleo accumbens; NE, núcleo entopeduncular; NH, núcleo habenular lateral; NS, núcleo subtalámico; NVL, núcleo vestibular lateral; ST, estriado; T, tálamo (modificado de Fagg y Foster, 1983).

6.- MAPA NEUROQUIMICO DE LA CORTEZA PREFRONTAL

En la CP están presentes la mayoría de los neurotransmisores conocidos en la actualidad. Así se ha descrito la presencia de catecolaminas, ACh, aminoácidos neurotransmisores y péptidos neurotransmisores entre los que se incluyen: NT, neurofisiina, bombesina, coleocistokinina, encefalina, neuropéptido Y, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo, así como receptores opiáceos. La coexistencia e interacción entre diferentes péptidos y neurotransmisores tales como DA, ACh, GLU y GABA ha sido descrita en diversas regiones cerebrales (Bean et al., 1990; Lapchak et al., 1990; Sanz, 1992). Dado que en las capas profundas de la CPM existen terminales que contienen DA, ACh y NT (Thierry et al., 1973; Houser et al., 1985; Studler et al., 1988) así como neuronas gabérgicas y glutamatérgicas (Fonnum et al., 1981a, 1981b; Fonnum 1984, Mora et al., 1986; Esclapez et al., 1987), el trabajo que aquí se presenta se centra en el estudio de los siguientes neurotransmisores: NT, DA, ACh, GLU, y GABA. En la fig. 13 se recoge un esquema del mapa neuroquímico propuesto para la CP de la rata.

6.1 Neurotensina

La inervación neurotensinérgica de la CPM procede de un grupo de neuronas que proyecta desde el AVT del mesencéfalo. En la CPM no existe NT intrínseca (Studler et al., 1988). En dicha zona cortical, la NT se encuentra coexistiendo con la DA, por tanto la mayor densidad de terminales neurotensinérgicas en la CPM se encuentra en las capas más profundas siguiendo un patrón paralelo al de las terminales dopaminérgicas (Seroogy et al., 1988; Studler et al., 1988).

En cuanto a la localización de los receptores neurotensinérgicos existe una mayor densidad en las capas V-VI de la CP (Lindwall y Bjorklund, 1974). La lesión con 6-OHDA del AVT produce un aumento del número de receptores de NT en la CP indicando que los receptores de NT en la CP se localizan principalmente a nivel postsináptico (Hervé et al., 1986). Así mismo, se ha visto que dichos receptores siguen una distribución paralela a los D1 (Studler et al., 1988; Tassin et al., 1988).

En general el efecto de la NT sobre las neuronas de la CP es excitador. Estudios electrofisiológicos muestran que la aplicación de NT produce la despolarización del 88% de las neuronas piramidales estudiadas (Audinat et al., 1989). Además de un incremento de los potenciales postsinápticos excitadores se produce un incremento de los inhibidores. La NT también podría activar las neuronas gabérgicas y el efecto neto de este péptido sobre las neuronas piramidales podría resultar de un balance entre una excitación directa de las neuronas piramidales y una inhibición

indirecta mediada por interneuronas gabérgicas (Audinat et al., 1989).

Dado que la NT está coexistiendo con la DA, son muchos los trabajos que estudian una posible interacción entre estos neurotransmisores (Seroogy et al., 1987;1988; Bean et al., 1990). Los efectos que produce la unión de NT a su receptor podrían deberse, al menos en parte, a una modulación de los receptores dopaminérgicos (fig. 12). Fuxe et al (1992) en un estudio realizado en neuronas estriatales de rata, afirman que la unión de NT a su receptor reduce la afinidad de los receptores D2 y aumenta la afinidad de los D1 este efecto se produce mediante la existencia de una interacción intramembrana entre los receptores neurotensinérgicos y dopaminérgicos. Dicha interacción parece implicar cambios alostéricos en la regiones adyacentes a los receptores y la activación de quinasas y fosfatasa (Fuxe et al., 1992). Estudios realizados por Bean y Roth (1992) han mostrado que estimulaciones a baja frecuencia del fascículo prosencefálico medial, produce una liberación *in vivo* sólo de DA en la CPM, mientras que a frecuencias mayores o a rafagas tanto la DA como la NT son liberadas. Estos autores apuntan también que la liberación diferencial de NT y DA en la CPM de la rata puede deberse a la activación de autoreceptores D2. Así, la estimulación de estos receptores D2 con agonistas DA produce una inhibición de la liberación de DA y un incremento de la liberación de NT (Bean et al., 1990).

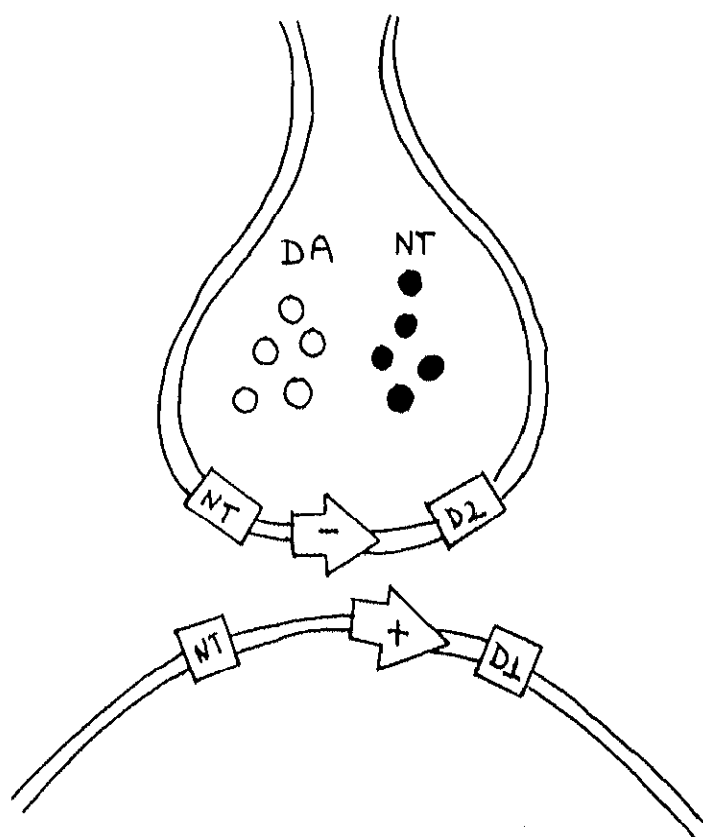


FIGURA 12: Representación esquemática de las posibles interacciones pre-postsinápticas entre los receptores neurotensinérgicos y dopaminérgicos en la CP de la rata (Studler et al., 1988; Fuxe et al., 1992; Retaux et al., 1991)

6.2 Dopamina

La inervación dopaminérgica de la CPM proviene de un grupo de neuronas que proyecta desde el AVT del mesencéfalo (Thierry et al., 1973; Lindvall y Bjorklund, 1974). Dicha proyección constituye el sistema mesocortical dopaminérgico. Las terminales dopaminérgicas en la CP se extienden a lo largo de las capas I-VI pero la mayor densidad se concentra en las capas más profundas (V-VI) (Emson y Koob, 1978; Tassin et al., 1988). Dichas terminales establecen contactos sinápticos con las neuronas piramidales de la CP (Van Eden et al., 1987; Seguela et al., 1988; Verney

et al., 1990), neuronas que son de naturaleza glutamatérgica y constituyen la principal eferencia de la CP (Fonnum et al., 1981a, 1981b; Fonnum 1984; Peinado y Mora 1986; Cotman et al., 1987).

Tanto los receptores D1 como los receptores D2 están presentes en la CP. Los receptores D1 son más numerosos que los D2 y se encuentran localizados principalmente en la capa VI (Boyson et al., 1986). Se ha sugerido la existencia de receptores D1 en las dendritas de las neuronas piramidales corticales (Retaux et al., 1991). Los receptores D2 se encuentran extendidos a lo largo de las capas II-VI (Boyson et al 1986). Existen autoreceptores D2 en las terminales corticales dopaminérgicas y también heteroreceptores en terminales de neuronas piramidales que proyectan a estriado (Retaux et al., 1991), así es posible la existencia de terminales colaterales recurrentes con receptore D2. La estimulación de los receptores D1 tiene un efecto excitador sobre las neuronas de la CP, mientras que la estimulación de los receptores D2 tiene un efecto inhibitor (Thierry et al., 1986). La estimulación de los autoreceptores D2 en la CPM, produce una liberación de NT y una inhibición de la liberación de DA (Bean et al., 1990).

La estimulación eléctrica del AVT, así como la aplicación microiontoforética de DA en la CP, produce una inhibición de la actividad de las neuronas corticales piramidales de las capas V-VI (Mora et al., 1976; Bernardi et al 1982; Bunney y Chiodo, 1984). Esta inhibición de las neuronas puede ser debida a un efecto directo de la DA sobre dichas neuronas y/o estar mediado por neuronas corticales gabérgicas.

No existen evidencias de una sinapsis directa entre las aferencias DA y las neuronas intracorticales gabérgica, aunque la organización anatómica de la innervación gabérgica y dopaminérgica indica una posible interacción DA-GABA-GLU (Verney et al., 1990). De hecho, estudios realizados *in vitro* muestran que la DA incrementa la liberación de GABA, así como el disparo de la interneuronas gabérgicas de la CP (Penit-Soria et al., 1987; Retaux et al., 1991).

6.3 Acetilcolina

La innervación acetilcolinérgica de la CPM proviene de aferencias que proyectan desde los núcleos basales de Meynert y de neuronas acetilcolinérgicas intrínsecas (Melusam et al., 1983; Houser et al., 1983; 1985). La mayor densidad de terminales acetilcolinérgicas se concentran en las capas más profundas de la CP siguiendo una distribución laminar similar a la de la DA. Las neuronas intrínsecas ACh se distribuyen a lo largo de las capas II-VI con una mayor concentración en las capas II-IV. Las terminales acetilcolinérgicas establecen sinapsis con las dendritas de las neuronas piramidales y con cuerpos de neuronas no piramidales (Houser et al., 1985).

Tanto los receptores M1 como los M2 están presentes en la corteza cerebral. Los M1 son más numerosos que los M2 y se distribuyen principalmente a lo largo de las capas II-III (Hammer et al., 1980). Se ha sugerido que en la corteza frontal de rata, los receptores M1, se encuentran a nivel postsináptico sobre las neuronas piramidales y a nivel presináptico sobre las terminales dopaminérgicas (Marchi et al., 1990; Chessell et al., 1993). Los receptores M2 se distribuyen a lo largo de la

capa III y V (Spencer et al., 1985) y se encuentran a nivel presináptico en las terminales acetilcolinérgicas (Marchi y Raiteri, 1985; Marchi et al., 1990).

Las acciones de la ACh a nivel cortical no son del todo conocidas. En general, parece tener un efecto facilitador de la transmisión sináptica aunque tras la aplicación microiontóforética de ACh se han encontrado acciones tanto excitadoras (Krnjevic y Phillis, 1961; Andrade, 1991; Bernardo, 1993) como inhibitoras (Phillis y York, 1967; Sillito et al., 1985; Vidal y Changeaux, 1993). Se piensa que la acción inhibitora de la ACh está mediada por interneuronas gabérgicas; así, esta inhibición ocurre más frecuentemente en capas con una mayor densidad de interneuronas GABA (Sillito et al., 1985).

Han sido muchos los estudios realizados en otras áreas cerebrales tales como estriado e hipocampo, donde se pone en evidencia la interacción de ACh con neurotransmisores tales como DA, GLU, y GABA (Ono et al., 1988; Xu et al., 1989) pero en la corteza cerebral dicha interacción está poco documentada. En la corteza cerebral de rata agonistas muscarínicos potencian la liberación evocada de DA por la activación de heteroreceptores supuestamente M1 y disminuyen la liberación de ACh por activación de autoreceptores M2 (Marchi y Raiteri, 1985; Meyer y Otero, 1985).

6.4 Aminoácidos neurotransmisores

6.4.1 Acido glutámico

La inervación glutamatérgica en la CPM de la rata procede de terminales de neuronas corticales piramidales y de aferencias tales como las procedentes del tálamo (Fonnum et al., 1981a; 1981b; Fonnum 1984; Peinado y Mora 1986; Cotman et al., 1987). Las neuronas piramidales se distribuyen a lo largo de las capas II-VI. La mayor densidad se encuentra en las capas II-VI y las de mayor tamaño están en la capa V. Sobre estas neuronas, que son la principal eferencia cortical a estructuras subcorticales, establecen sinapsis terminales dopaminérgicas procedentes del AVT (Van Eden et al., 1987, Seguela et al., 1988; Verney et al., 1990); terminales acetilcolinérgicas procedentes de los núcleos basales de Meynert (Houser et al., 1985) y neuronas intrínsecas gabérgicas (Houser et al., 1984). La aplicación iontoforética de GABA y de DA produce una inhibición de las neuronas piramidales (Penit-Soria et al., 1987; Sesack et al., 1989), mientras que la aplicación iontoforética de ACh y NT produce una excitación (Audinat et al., 1989; Bernardo, 1993), aunque hay estudios en los que se ha encontrado una inhibición (Phillis y York, 1967; Sillito et al., 1985).

En cuanto a los receptores glutamatérgicos la mayor densidad de receptores corticales NMDA se localiza en la CP, concretamente en la CPM (Fonnum et al., 1981a, 1981b; Fonnum 1984; Mora et al., 1986; Esclapez et al., 1987). Dichos receptores al igual que los receptores AMPA se localizan principalmente en las capas I-III, y los receptores KA se localizan en las capas V-VI (Cotman et al., 1987). En las terminales axónicas de las

neuronas piramidales que proyectan a estriado existen receptores D2, los cuales también podrían estar presentes en terminales colaterales recurrentes (Retaux et al., 1991). Se sugiere que sobre las neuronas piramidales existan, a nivel cortical, receptores NT, D1 y M1 (Retaux et al., 1991; Audinat et al., 1989; Chessell et al., 1993) así como receptores GABA-A y GABA-B (Pirrot et al., 1992; Bonanno y Raiteri, 1993).

Las acciones del GLU en todo el SNC son excitadoras. La aplicación iontoforética de GLU en la corteza cerebral produce una excitación de las neuronas corticales (Krnjevic y Phillis, 1963). Estudios realizados *in vitro* muestran que en la corteza frontral GLU estimula la liberación de DA por activación de los receptores NMDA (Jones et al., 1993).

6.4.2 GABA

En la corteza cerebral de la rata GABA se encuentra localizado mayoritariamente en interneuronas, aunque también existen vías de proyección desde núcleos subcorticales. Concretamente en la CPM existen aferencias gabérgicas que proyectan desde el AVT (Pirrot et al., 1992). La distribución de las interneuronas gabérgicas es bastante homogénea a lo largo de la corteza cerebral y se concentran principalmente en las capas II-IV (Houser et al., 1984). Las terminales gabérgicas establecen contactos sinápticos sobre el cuerpo y sobre el segmento inicial del axon de las neuronas piramidales (Houser et al., 1984; Verney et al., 1990).

En las interneuronas gabérgicas existen autoreceptores GABA-B cuya activación produce una inhibición de la liberación de GABA (Bonanno et al.,

1988). Se sugiere la existencia de heteroreceptores GABA-B y GABA-A en las terminales glutamatérgicas (Bonanno y Raiteri, 1993).

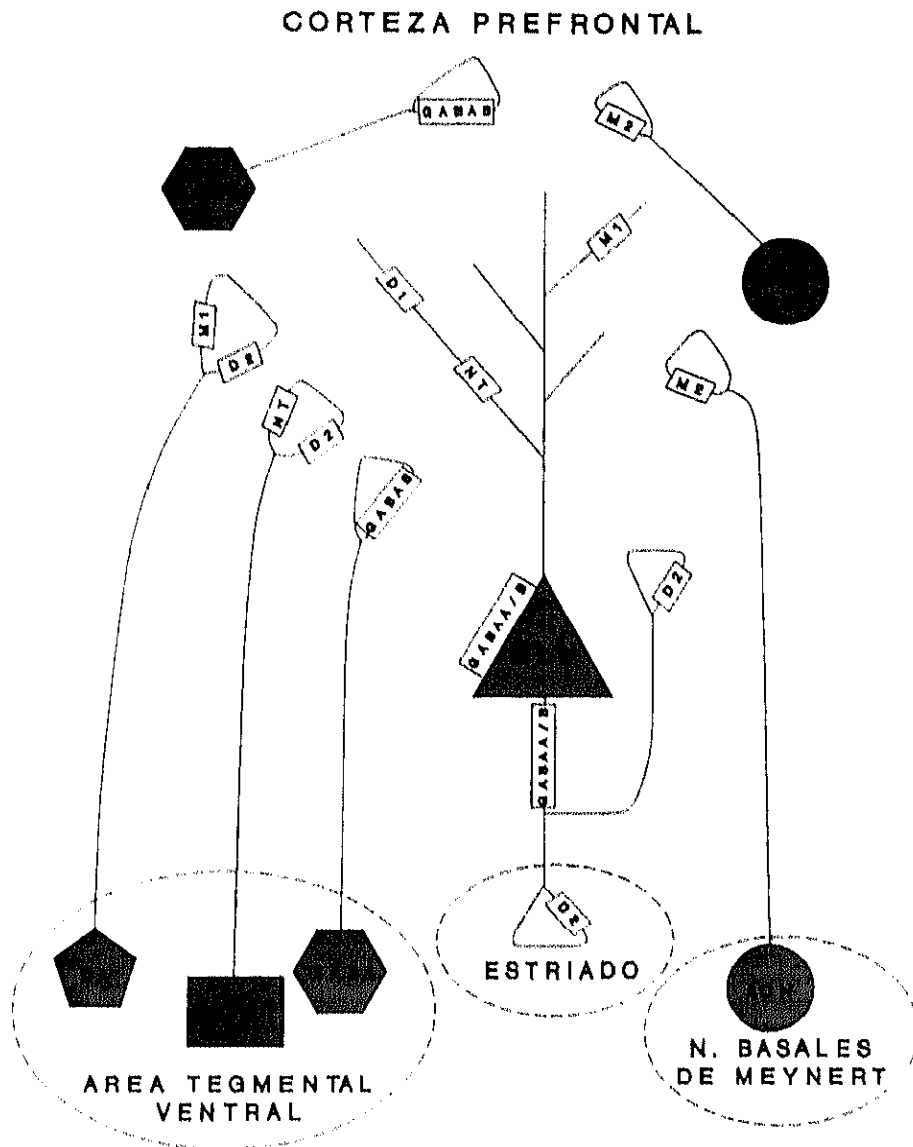


FIGURA 13: Mapa neuroquímico propuesto en la CP de la ratona (Houser et al., 1985; Van Eden et al., 1987; Studler et al., 1988; Marchi et al., 1990; Retaux et al., 1991; Pirot et al., 1992; Chessell et al., 1993; Bernardo, 1993; Bonanno y Raiteri, 1993)

7.- RESUMEN Y PLANTEAMIENTO

La CPM se define como el área cortical que recibe las proyecciones del núcleo dorsomedial del tálamo. Son muchos los neurotransmisores presentes en la CPM; este trabajo se centra en el estudio de la interacción de la NT, la DA y la ACh con los aminoácidos neurotransmisores GLU y GABA, en esta área del cerebro.

Los aminoácidos neurotransmisores GLU y GABA son, respectivamente, el neurotransmisor excitador e inhibitor más abundantes en todo el SNC. El GLU presente en la CPM proviene de terminales de neuronas corticales piramidales, así como de aferencias subcorticales tales como las que proyectan del tálamo (Fonnum et al., 1981a-b; Fonnum, 1984; Peinado y Mora, 1986; Cotman et al., 1987). En cuanto al GABA se localiza principalmente en interneuronas aunque también existen en la CPM aferencias que proyectan desde el AVT del meséncéfalo (Pirot et al., 1992). Las terminales gabérgicas sinapsan directamente sobre el cuerpo y sobre el segmento inicial del axón de las neuronas piramidales, siendo éste el contacto sináptico más frecuente que se establece en la CPM. Existen autoreceptores GABA-B y se sugiere la existencia de heteroreceptores GABA-A y GABA-B sobre las neuronas piramidales (Pirot et al., 1992; Bonanno y Raiteri, 1993).

La NT es un neuropéptido que se encuentra coexistiendo con DA en

terminales que proyectan desde el AVT del mesencéfalo, de forma que en dicho área cortical existen terminales dopaminérgicas y terminales mixtas DA/NT (Seroogy et al., 1988; Studler et al., 1988). En la CPM no existe NT intrínseca. Los receptores de NT se encuentran principalmente a nivel postsináptico y siguen una distribución paralela a los receptores D1 (Hervé et al., 1986; Studler et al., 1988; Tassin et al., 1988), de forma que las neuronas piramidales glutamatérgicas posiblemente tengan receptores para NT. El efecto de la NT sobre las neuronas piramidales es excitador (Audinat et al., 1989); así mismo, NT produce un aumento de la liberación de DA, posiblemente por una modulación de los receptores dopaminérgicos D2 (Bean et al., 1990; Fuxe et al., 1992).

La DA presente en el CPM procede de terminales que proyectan desde el AVT del mesencéfalo, (Thierry et al., 1973; Linwall et al., 1974). Dichas terminales sinapsan sobre las neuronas piramidales (Van Eden et al., 1987; Seguella et al., 1988; Verney et al., 1990). Se sugiere la existencia de receptores D1 en las dendritas de las neuronas piramidales (Retaux et al., 1991). En cuanto a los receptores D2, están presentes en las terminales de las neuronas piramidales que proyectan a estriado, y posiblemente en terminales colaterales recurrentes (Retaux et al., 1992). La activación de los receptores D1 tiene un carácter excitador mientras que la activación de los receptores D2 tiene un carácter inhibitorio (Thierry et al., 1986).

La ACh está presente en la CPM y proviene de neuronas intrínsecas acetilcolinérgicas, así como de aferencias que proyectan desde los núcleos basales de Meynert (Melusam et al., 1983; Houser et al., 1983; 1985). Dichas aferencias acetilcolinérgicas sinapsan sobre las neuronas

piramidales (Houser et al., 1985). Posiblemente en las dendritas de las neuronas piramidales existen heteroreceptores M1 así como sobre las terminales dopaminérgicas (Ono et al., 1988; Marchi et al., 1990; Chessell et al., 1993); los receptores M2 se encuentran principalmente a nivel presináptico sobre las terminales acetilcolinérgicas (Ono et al., 1988; Marchi et al., 1990). La activación de los receptores supuestamente M1 producen un aumento de la liberación de DA (Marchi y Raiteri, 1985; Ono et al., 1990), la estimulación de los receptores M2 producen una disminución de la liberación de ACh (Meyer y Otero, 1985). El papel de la ACh sobre las neuronas piramidales es principalmente excitador, aunque hay estudios en los que se ha encontrado una inhibición. Dicha inhibición podría estar mediada por interneuronas gabérgicas (Sillito et al., 1985; Bernardo, 1993; Vidal y Changeaux, 1993).

El trabajo que aquí se presenta trata de estudiar el efecto que tiene cada uno de estos neurotransmisores sobre los niveles extracelulares de GLU y GABA en la CPM para, de esta forma, aportar datos que permitan inferir aspectos funcionales de la interacción de neurotransmisores en este área del cerebro. Para ello, por medio de la técnica de perfusión intracerebral *in vivo push-pull* se perfundió intracerebralmente y en el animal despierto agonistas neurotensinérgicos (NT), dopaminérgicos (apomorfin, agonista D1-D2) y acetilcolinérgicos (arecolina, agonista M1-M2; oxotremorina, agonista M2; McN-A-343, agonista M1) así como el bloqueante dopaminérgico, haloperidol (bloqueante D1-D2) y el acetilcolinérgico, PZ (bloqueante M1). Para ello se realizaron los siguientes bloques experimentales:

- Bloque experimental 1: efecto de la perfusión intracortical de NT y de NT tras la inyección intraperitoneal previa de HL sobre la [GLU] en la CPM de la rata despierta.

- Bloque experimental 2: efecto de la perfusión intracortical de apomorfina (APO) y de APO tras la inyección intraperitoneal previa de HL sobre la [GLU] y la [GABA] en la CPM de la rata despierta.

- Bloque experimental 3:

Experimento 1: Efecto de la perfusión intracortical de arecolina (ARE) sobre la [GLU] y la [GABA] en la CPM de la rata despierta.

Experimento 2: Efecto de la inyección i.p. de oxotremmorina (OXO) sobre la [GLU] y la [GABA] en la CPM de la rata

Experimento 3: efecto de la perfusión intracortical de McN-A-343 (McN) y de McN tras la perfusión intracortical previa de PZ sobre la [GLU] y la [GABA] en la CPM de la rata despierta.

MATERIALES Y METODOS

1.- ANIMALES

Los animales utilizados para los experimentos fueron ratas adultas macho, raza Wistar, con un peso comprendido entre 250-350 g, lo que corresponde a una edad de 2-3 meses. Las ratas fueron suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Granada y por el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Durante la experimentación los animales fueron individualizados en jaulas y mantenidos en una habitación de 20-25°C y un fotoperiodo de 12 horas. La comida y bebida fueron suministradas *ad libitum*.

2.- MATERIAL.

2.1 Construcción de implantes para la perfusión intracerebral *in vivo*

Los implantes empleados para la perfusión intracerebral *in vivo* fueron diseñados en nuestro laboratorio y constan de los siguientes elementos:

- dos piezas cilíndricas de metacrilato acoplables según un sistema macho-hembra (fig. 14), construidas por el Taller de Asistencia a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid,
- una cánula guía de acero inoxidable de 0,90 mm (20 ga) ϕ externo, 0,66 mm de ϕ interno y 10 mm de longitud, que se utiliza para guiar el sistema de cánulas *push-pull*,
- una cánula de acero inoxidable de 0,63 mm (23 ga) de ϕ externo y 10,2 mm de longitud que se utiliza para cerrar la cánula guía (fiador),
- un tornillo de 3 mm de ϕ .

La cánula guía se une a la base de la pieza de metacrilato hembra, con cianoacrilato (fig.14a), siendo este conjunto el que se implanta en el cerebro del animal. Cuando se va a realizar la perfusión intracerebral se

acopla la pieza de metacrilato macho (fig.14b) y se fija con el tornillo. El sistema de cánulas *push-pull* se introduce a través de la pieza macho hasta alcanzar la cánula guía. La principal ventaja de este implante radica en que, por medio del tornillo que se encuentra perpendicular a este implante, el sistema de cánulas *push-pull* queda completamente fijo durante toda la perfusión.

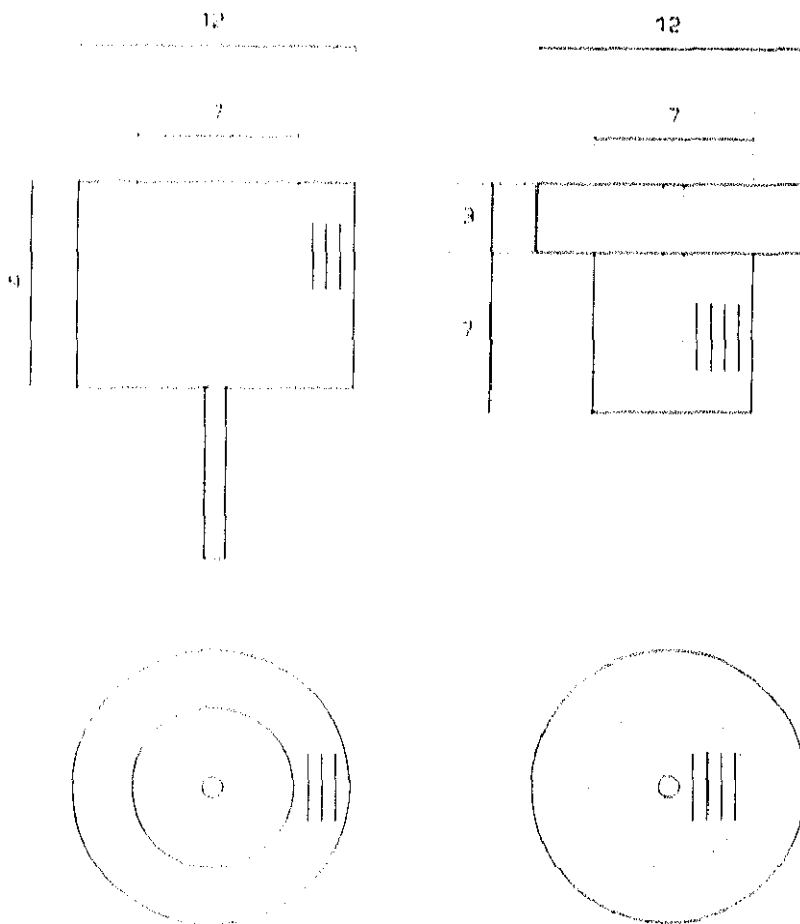


FIGURA 14: Esquema del implante para la perfusión intracerebral *push-pull*. (Dimensiones en mm) A) pieza hembra B) pieza macho (Segovia, 1995).

2.2 Construcción del sistema de cánulas de perfusión *push-pull*

El material empleado para la construcción de las cánulas fue el siguiente:

- cánulas de acero inoxidable de 18 ga de ϕ externo y 12 mm de longitud,
- cánulas de acero inoxidable de 23 ga de ϕ externo y longitudes de 10 a 20 mm.
- cánula de acero inoxidable de 30 ga de ϕ externo y 34 mm de longitud,

El sistema de cánulas *push-pull* se construye de la siguiente manera (ver fig. 15); se introduce la cánula de 30 ga o cánula *push* en el interior de una cánula de 23 ga y 20 mm de longitud que es la cánula *pull* (fig. 15a). La cánula *push* debe sobresalir 0,3 mm aprox. por debajo de la cánula *pull* con el fin de que tanto la succión del líquido de perfusión como el arrastre de sustancias liberadas sea óptimo. Este sistema concéntrico se introduce a su vez en el interior de una cánula de 18 ga y 12 mm de longitud de forma que por uno de los extremos sobresale el sistema concéntrico y por el otro la cánula *push* y otra cánula *pull* biselada de 23 ga de diámetro y 10 mm de longitud (fig. 15b). Ambos extremos de la cánula de 18 ga se sueldan con estaño formándose así una cámara perfectamente cerrada en la que el líquido de perfusión penetra a través de la cánula

pull del sistema concéntrico y es recogido a través de la cánula *pull* biselada (fig. 15c).

El resultado final es un sistema de cánulas en el que el líquido de perfusión es introducido a través de la cánula *push* y es recogido a través de la cánula *pull*.

2.3 Preparación de Equithesin

El anestésico Equithesin fue preparado en el laboratorio disolviendo 21,25 g de hidrato de cloral en 49,4 ml de etanol absoluto. Posteriormente se añade de forma secuencial:

- 4,86 g de pentobarbital sódico disuelto,
- 198 ml de 1.2-propilenglicol,
- 10,63 g de sulfato magnésico disueltos en 50 ml de agua bidestilada,
- agua bidestilada c.s.p 500 ml.

La solución obtenida debe conservarse a temperatura ambiente.

2.4 Preparación de drogas

Las drogas utilizadas en los experimentos que constituyen esta Tesis Doctoral han sido las siguientes:

- Neurotensina, Sigma.

Materiales y Métodos

- Clorato de apomorfina, MacFaralan Smith LTP,
- Acido L-ascórbico, Sigma,
- Haloperidol, Sigma,
- Arecolina, Sigma,
- Sesquifumarato de oxotremorina, Sigma,
- McN-A-343, Sigma,
- Dihidroclorato de pirenzepina, Sigma.

NT, ARE, McN y PZ, fueron perfundidas intracerebramente, para lo cual se disolvieron en LCRs, 10 min. antes de ser utilizadas. Una vez disuelta la droga se colocó en una jeringa Hamilton que fue recubierta con papel de aluminio para evitar posibles degradaciones por la luz.

APO, se perfundió intracerebramente, pero para evitar su oxidación, se disolvió en una solución de ácido ascórbico 0,57 mM, preparada con LCRs. De la misma manera que en el caso anterior, la disolución de la droga se hizo 10 min. antes de ser utilizada y una vez que estuvo disuelta se colocó en una jeringa Hamilton recubierta con papel de aluminio.

Haloperidol (HL) y oxotremorina (OXO), fueron inyectadas intraperitonealmente, para lo cual se disolvieron en suero fisiológico.

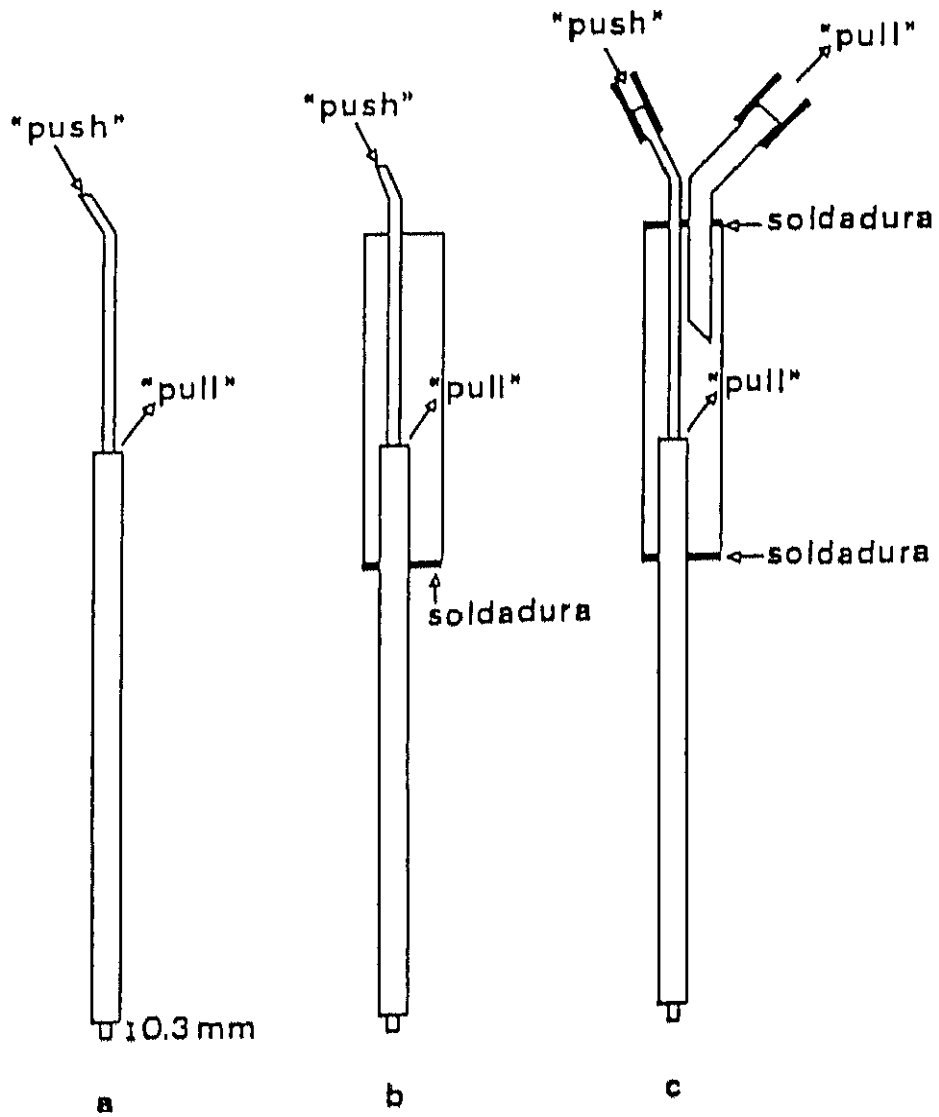


FIGURA 15: Representación esquemática de la construcción de las cánulas *push-pull*.

3.- METODOS EXPERIMENTALES

3.1- Procedimiento quirúrgico: estereotaxia

Los implantes para la perfusión intracerebral *in vivo* fueron estereotáxicamente implantados en el cerebro del animal mediante una intervención quirúrgica. El material empleado en dicha intervención fue el siguiente:

- bisturí (1),
- destornillador de relojero (1),
- pinzas hemostáticas (4),
- pinzas rectas (1),
- resina plástica Ivoclar. Internacional
Dental Products,
- Spongostan Film. Ferrosan Danmark,
- tornillos de tapa Micro 57,
- espátula recta (1),
- punta de insulina,
- estereotáxico para roedores. David Kopf Instrument 900,
- fresas de corona esférica de 1,7 mm de diámetro,
- motor porta fresas Casali DSE-47.

El instrumental quirúrgico previamente a su utilización fue esterilizado en un autoclave y se mantuvo en una solución de armil al 1% durante toda la intervención.

Previamente a la operación las ratas fueron pesadas y posteriormente anestesiadas con Equithesin (ver preparación en el apartado 2.3 de Material y Métodos) vía intraperitoneal a la dosis de 2 ml/kg de peso. Una vez que el animal estuvo profundamente anestesiado se colocó en un estereotáxico para roedores David Kopf 900. El cráneo de la rata se fijó y se centró introduciendo sendos ejes en ambos conductos auditivos externos y pinzando el maxilar superior 4 mm por debajo de la línea interaural. De esta forma, el cráneo de la rata, quedó perfectamente fijado y centrado en los planos horizontal y vertical.

Posteriormente se pasó a descubrir la calota mediante una incisión longitudinal de la piel que la cubre. Una vez expuesta la calota, se localizó sobre su superficie el punto Bregma (fig. 16a). Este punto fue utilizado como referencia en la obtención de las coordenadas estereotáxicas anteroposterior y lateral. En el caso de la CPM, las coordenadas estereotáxicas derivadas del atlas de König y Klippel (1967) fueron las siguientes: 3,6 mm anterior a Bregma; 0,9 mm lateral a la línea media y 2,5 mm de profundidad por debajo de la duramadre.

Con una broca aplicada a un motor portabrocas se abrieron dos orificios en la calota donde se emplazaron los tornillos de fijación.

Seguidamente se abrió el orificio para la cánula guía en el lugar previamente determinado (fig. 16a). A continuación se localizó la superficie de la duramadre, tomándose esta como referencia para la coordenada de profundidad. Posteriormente se rasgó superficialmente la duramadre con una aguja y se introdujo la cánula guía 0,5 mm por debajo de la superficie dural.

El implante se fijó a la calota con resina plástica Ivoclar. Una vez que la resina hubo fraguado se introdujo el fiador en el interior de la cánula guía (fig. 16b).

Finalizada la operación se colocó el animal en su jaula, vigilándose la ingesta de comida y bebida, así como el peso durante los días siguientes a la intervención. Diariamente se movilizaron los fiadores, limpiándose en etanol al 70% con el fin de mantener permeables las cánulas.

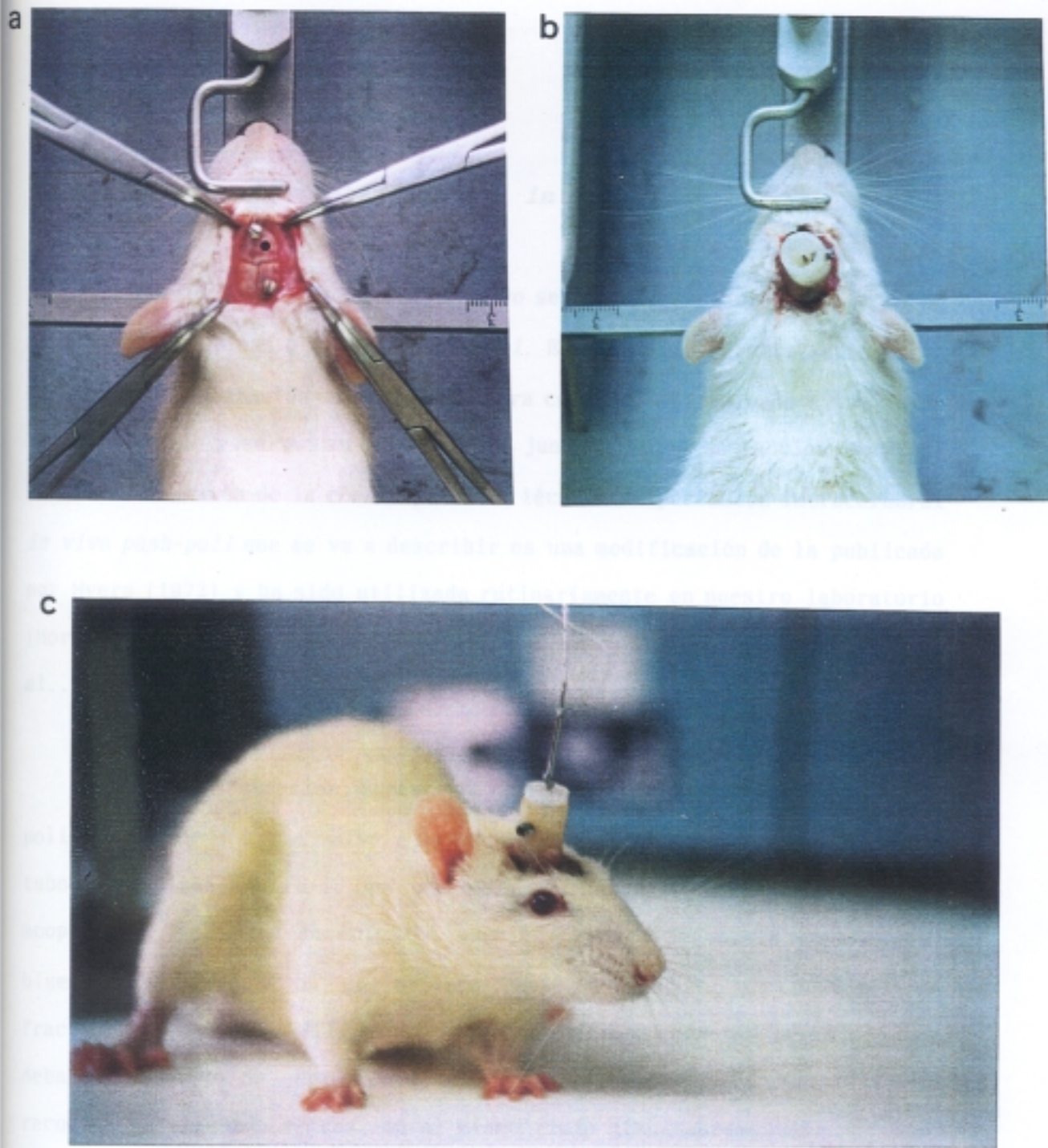


FIGURA 16: A-B) Dos fases diferentes de una operación quirúrgica realizada en uno de los animales de experimentación. C) Imagen de un animal durante uno de los experimentos.

3.2 Perfusión intracerebral *in vivo*

La perfusión intracerebral *in vivo* se realizó mediante un sistema de cánulas concéntricas o cánulas *push-pull*. Este sistema permite la infusión de líquido de perfusión en una estructura cerebral determinada a través de la cánula *push* y su posterior recogida junto con las sustancias químicas liberadas a través de la cánula *pull*. La técnica de perfusión intracerebral *in vivo push-pull* que se va a describir es una modificación de la publicada por Myers (1972) y ha sido utilizada rutinariamente en nuestro laboratorio (Mora y Porrás, 1993; Porrás y Mora, 1993; Sanz et al., 1993; Expósito et al., 1994).

El extremo superior de la cánula *push* se unió mediante un tubo de polietileno P-10 a una válvula de 4 vías Harward 4-4 HV. De aquí parte un tubo de polietileno PE-10 que va unido a una jeringa Hamilton de 5 ml acoplada a una bomba de infusión succión Harward 940-A. La cánula *pull* biselada se unió a un polietileno PE-50 acoplado a un colector de fracciones Jayte 5512 (fig. 17). El colector de fracciones se colocó por debajo del punto de perfusión a una distancia tal que la infusión y la recogida del líquido se realizó al mismo flujo simultáneamente.

Las perfusiones intracerebrales *in vivo* se realizaron 4 días después de la intervención quirúrgica.

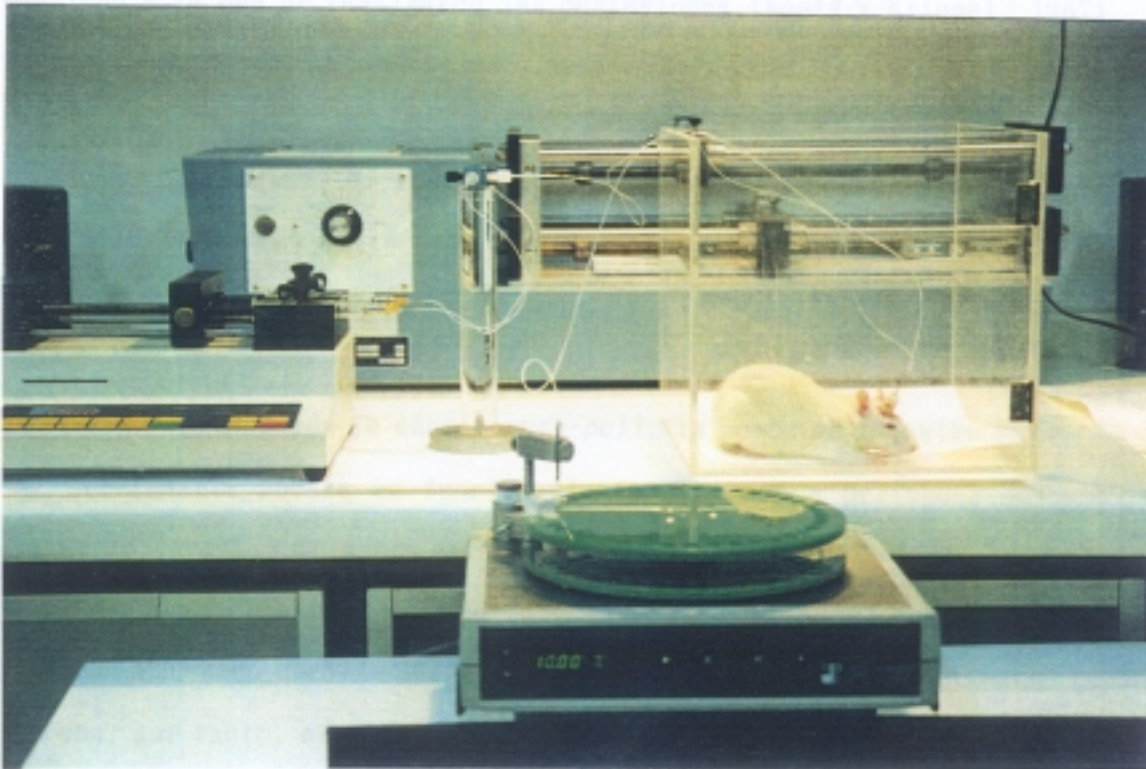
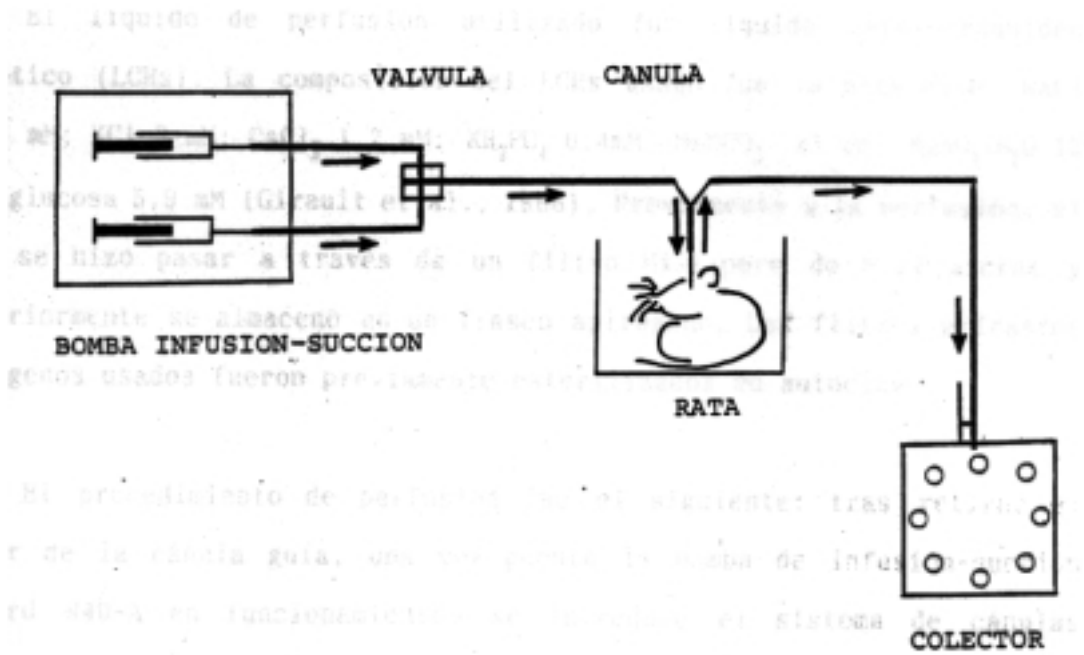


FIGURA 17: Representación esquemática e imagen fotográfica del sistema completo utilizado para la representación de los experimentos mediante la técnica de *push-pull* continuo.

Materiales y Métodos

El líquido de perfusión utilizado fue líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs). La composición del LCRs usado fue la siguiente: NaCl 122,0 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4mM; NaHCO₃ 25 mM; MgSO₄·7H₂O 12 mM y glucosa 5,9 mM (Girault et al., 1986). Previamente a la perfusión, el LCRs se hizo pasar a través de un filtro Millipore de 0,22 micras y posteriormente se almacenó en un frasco apirógeno. Los filtros y frascos apirogenos usados fueron previamente esterilizados en autoclave.

El procedimiento de perfusión fue el siguiente: tras retirar el fiador de la cánula guía, una vez puesta la bomba de infusión-succión Harward 940-A en funcionamiento, se introdujo el sistema de cánulas concéntricas o cánulas *push-pull*. En este trabajo, se perfundió la CPM. La profundidad a la que se realizaron las perfusiones (Konig y Klippel, 1967) fue de 2,5 mm desde la superficie dural. Dado que la cánula guía se introdujo 0,5 mm por debajo de la duramadre en el momento de la intervención quirúrgica, el sistema de perfusión debe sobresalir 2 mm por debajo de la cánula guía. La longitud del sistema de perfusión se ajustó con un tope de polietileno PE-50.

Una vez introducida la cánula *push-pull*, la bomba de infusión Harward 940-A, previamente puesta en funcionamiento, comenzó a perfundir LCRs a través de la cánula *push* a una velocidad de 20 µl/min. Este LCRs, después de bañar un área cerebral de aproximadamente 1,5 mm de diámetro (Myers, 1986), fue recogido por la cánula *pull*. En el perfundido obtenido se encontraba, por tanto, el LCRs infundido junto con las sustancias liberadas en dicha área cerebral.

Materiales y Métodos

El protocolo de perfusión utilizado se ajustó a las necesidades de cada uno de los experimentos. En todos ellos la perfusión se realizó de forma continua durante 150 min. El tiempo de recolección de cada muestra fue de 10 min. Se comprobó experimentalmente (Sanz, 1992) que los niveles de aminoácidos analizados alcanzaban estabilidad una vez transcurridos 50 min de perfusión continua, por lo cual las muestras recogidas durante los primeros 50 min de perfusión no se analizaron.

Los protocolos de perfusión utilizados han sido los siguientes:

PROTOCOLO 1: Una vez transcurridos los 50 primeros minutos de estabilización se recogieron, durante 50 min, 5 perfundidos pre-estímulo donde se obtuvieron los niveles extracelulares basales para cada aminoácido. Entre los minutos 50-60 (perfundido 6) mediante el giro de una válvula de una llave de 4 vías Harward HV 4-4, se cambió el líquido de perfusión. Durante este perfundido el líquido de perfusión fue LCRs que llevaba disuelta la droga en estudio. Posteriormente, mediante un nuevo giro de la llave de la válvula de 4 vías Harward HV 4-4 la perfusión continuó con LCRs. Estos 4 últimos perfundidos (perfundidos 7, 8, 9,10) nos sirvieron para ver niveles de aminoácidos post-estímulo.

PROTOCOLO 2: Una vez transcurridos los 50 minutos de estabilización se recogieron muestras durante 30 min. Se analizaron, por tanto, 3 perfundidos basales. Durante los minutos 30-50 (perfudidos 4-5), tal y como se describe en el protocolo anterior, se pasó a perfundir LCRs que llevaba disuelta una droga A. En el intervalo 50-60 (perfundido 6), se perfundió LCRs que llevaba disuelta una droga B. Durante los minutos 60-100

(perfundidos 7, 8, 9 y 10) se perfunde LCRs, se recogen por tanto 4 perfundidos post-estímulo.

PROTOCOLO 3: Una vez transcurridos los 50 minutos de estabilización comenzaron a recogerse las muestras. En este protocolo no existe cambio del medio de perfusión. El medio de perfusión es en todo momento LCRs. La droga en estudio se inyecta intraperitonealmente (i.p) en el minuto 40 de la perfusión, esto es, al principio del perfundido 4. Se recogieron, por tanto, 4 perfundidos basales y 6 perfundidos post-inyección.

PROTOCOLO 4: En este protocolo se inyectó una droga A, 10 min antes de comenzar la perfusión. Después la perfusión se realiza según el protocolo 1, es decir, en el intervalos 50-60 (perfundido 6) se perfunde con LCRs que lleva disuelto una droga B.

Estos protocolos se han realizado con los siguientes grupos experimentales:

- Grupo experimental 1: Protocolo 1. Perfusión de NT a las dosis de 1000 , 100 y 10 nM durante el perfundido 6.
- Grupo experimental 2: Protocolo 4. Inyección i.p de HL (3mg/kg) diez minutos antes de comenzar el experimento y perfusión de NT a la dosis de 1000 nM durante el perfundido 6.
- Grupo experimental 3: Protocolo 1. Perfusión de APO a las dosis de 5, 10 y 20 μ M durante el perfundido 6.

Materiales y Métodos

- Grupo experimental 4: Protocolo 4. Inyección i.p de HL (3mg/kg) 10 min antes de comenzar el experimento y perfusión de APO a la dosis de 10 μ M durante el perfundido 6.
- Grupo experimental 5: Protocolo 1. Perfusión de ARE a la dosis de 50, 100 y 200 mM durante el perfundido 6.
- Grupo experimental 6: Protocolo 3. Inyección i.p de OXO a la dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg en el minuto 40 (principio del perfundido 4).
- Grupo experimental 7: Protocolo 1. Perfusión de McN-A-343 a la dosis de 1, 10 y 100 μ M durante el perfundido 6.
- Grupo experimental 8: Protocolo 2. Perfusión de PZ (100 μ M) durante los perfundidos 4-5 y perfusión de McN-A-343 a la dosis de 10 μ M durante el perfundido 6.

Una vez obtenidos los perfundidos se hicieron pasar a través de un filtro Millpore de 0,45 μ m. Inmediatamente después las muestras se almacenaron a - 80°C hasta el momento de su análisis.

3.3. Análisis de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

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

El cromatógrafo consta de una pre-columna seguida de una columna, ambas de fase de fase inversa Resolve C₁₈ (Waters). La columna tiene una longitud de 15 cm, 5 µm de tamaño de partícula y 90 Å de diámetro de poro.

3.3.1.-Cuantificación de aminoácidos como OPA-derivados

Para la detección y cuantificación de los aminoácidos presentes en las muestras de perfundido, se realizó una derivación pre-columna con el reactivo ácido o-ftaldialdehído-3-mercaptopropiónico (OPA-3-mercaptopropiónico), de acuerdo con el método descrito por Jones et al. (1981) y modificado por Lerma et al. (1986).

El material necesario para la preparación del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico es el siguiente:

- Borato sódico (Na₂B₄O₇ · 10H₂O). Merck.
- Metanol grado HPLC. Me 306. Scharlau.
- O-ftaldialdehído (OPA). P-1378. Sigma.
- Acido 3-mercaptopropiónico. M-6750. Sigma.

El reactivo se prepara del siguiente modo: tras disolver 32 mg de OPA en 800 µl de metanol, se añaden 7140 µl de una solución de tampón borato 0,1 M ajustada a un pH de 9,5. Posteriormente se añaden 54 µl de ácido 3-mercaptopropiónico. La solución debe conservarse a temperatura ambiente en un frasco opaco y cerrado. El reactivo preparado posee una validez de 15 días.

La derivación pre-columna de los aminoácidos fue realizada de la siguiente manera: a una alícuota de muestra de 20 µl se le incorporaron 4 µl de estándar interno (homoserina 0,05 mM). Posteriormente se añadieron 10 µl del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico. La mezcla resultante, se agitó en un vórtex durante 15 segundos para favorecer la reacción. Transcurrido 1 minuto de la adición del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico a la muestra se añadieron 5 µl de ácido acético al 5% con el fin de disminuir el pH de la mezcla y evitar la pérdida de sílice de la columna. Finalizada la derivación, se inyectan en el cromatógrafo 20 µl de la solución obtenida mediante un inyector tipo Reodhyme de volumen fijo de 20 µl.

3.3.2.-Condiciones cromatográficas

Para conseguir una correcta separación de los picos correspondientes a cada aminoácido se empleó un gradiente de 2 fases móviles, con un flujo constante de entrada a la columna de 1 ml/min (Herranz et al., 1985).

Los reactivos empleados en la preparación de las dos fases móviles utilizadas fueron los siguientes:

- Tampón acetato sódico 4 M. Pierce.
- Alcohol isopropílico grado HPLC. Al 315. Scharlau.
- Metanol grado HPLC. Me 306. Scharlau.
- Agua ultrapura obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore) y filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45 µm.

La fase móvil A consistió en una solución 95/5 (v/v) de tampón

Materiales y Métodos

acetato sódico 50 mM y metanol, a la que se le añadieron 12,5 ml de alcohol isopropílico por cada litro de mezcla. El tampón acetato sódico utilizado en la fase móvil A se preparó a partir de una solución de acetato sódico 4 M con pH ajustado a 5,67 y filtrada a través de un filtro Millipore de 0,45 μm .

La fase móvil B consistió en una mezcla 70/30 (v/v) de metanol y agua.

Previamente a su utilización, ambas soluciones se introdujeron en un baño de sonicación durante 15 min para su degasificación. Posteriormente se colocaron en el cromatógrafo. Durante 5 min ambas soluciones se sometieron a un burbujeo de helio a un flujo de 100 ml/min. Durante el proceso de análisis el flujo de helio fue de 10 ml/min.

El programa de gradientes empleado fue el siguiente:

<u>TIEMPO (min)</u>	<u>FLUJO (ml/min)</u>	<u>Fase A (%)</u>	<u>Fase B (%)</u>
0,00	1,00	90	10
9,00	1,00	52	48
12,00	1,00	0	100
16,00	1,00	0	100
16,01	1,00	90	10
20,00	1,00	90	10

Los 16 primeros min de este programa de gradientes fueron usados para el análisis de las muestras; los 4 min siguientes fueron usados como programa de preparación para un nuevo análisis.

La detección de los aminoácidos OPA-derivados se realizó con un detector de fluorescencia Waters 420-AC con un filtro de excitación de 340 nm y un filtro de emisión de 460 nm.

El cálculo de factores de respuesta (RF), tiempos de retención (RT) y la cuantificación de los aminoácidos se llevó a cabo con un integrador registrador Waters 745 siguiendo el método del estándar interno. El estándar interno empleado fue la homoserina (Peinado et al, 1986). En la fig. 18 puede verse un ejemplo de cromatogramas obtenidos con las condiciones descritas.

3.3.2.1 Factor de dilución

El hecho de realizar una derivación pre-columna de la muestra o de la solución patrón obliga a calcular el factor de dilución. Para ello debe calcularse el volumen de muestra que se encuentra en la mezcla inyectada. La preparación de la muestra, mencionada en el apartado 3.3.1. de Material y Métodos, se hizo añadiendo a los 20 μ l de muestra o solución patrón 4 μ l de estándar interno, 10 μ l de OPA-3-mercaptopropiónico y 5 μ l de ácido acético al 5%. El volumen final de la mezcla fue, por tanto, de 39 μ l. De estos 39 μ l se inyectaron 20 μ l en el cromatógrafo. El volumen total de muestra inyectado resultó ser, por tanto, de 10,256 μ l. El factor de dilución se calculó hallando la inversa del volumen de muestra inyectado, resultando ser de $1/10,256 = 0,0975$. La concentración de cada aminoácido presente en la muestra se calculó multiplicando la cantidad medida de dicho aminoácido por el factor de dilución 0,0975.

3.3.2.2. Calibración

La calibración se realiza con el fin de dar al integrador valores de referencia de los tiempos de retención y factores de respuesta de cada aminoácido analizado. El tiempo de retención de cada sustancia es el tiempo medio que tarda en salir de la columna del cromatógrafo y es utilizado por el integrador para identificarla. El factor de respuesta de cada sustancia es un valor que relaciona las concentraciones conocidas de esta sustancia y del estándar interno con las áreas de los picos cromatográficos.

Para la calibración del cromatógrafo, se prepararon soluciones estándar de cada uno de los aminoácidos analizados a una concentración de 0,05 mM. El disolvente empleado en todas las disoluciones fue LCRs. Los aminoácidos empleados fueron los siguientes:

- L-Glutamato. Sigma.
- DL-Homoserina. Sigma.
- GABA. Sigma.

El disolvente empleado en todas las disoluciones fue LCRs. A continuación estas soluciones estándar se introdujeron en un baño de sonicación durante 15 min para obtener una correcta disolución.

El tiempo de retención de cada aminoácido se obtuvo tras la inyección de 4 µl de la solución estándar de dicho aminoácido diluidas en 20 µl de LCRs convenientemente derivados (tal y como se describe anteriormente).

Materiales y Métodos

El factor de respuesta para cada aminoácido se obtuvo tras inyectar 5-10 alícuotas de solución patrón. La solución patrón se obtuvo mezclando 150 µl de la solución estándar de cada aminoácido, excluido el estándar interno, y separando alícuotas de 20 µl. Las soluciones patrón así obtenidas se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su utilización. Previamente a su inyección las soluciones patrón se derivaron tal y como se describe en el apartado 3.3.1.

La inyección en el cromatógrafo Waters 600E de 5 a 10 alícuotas de solución patrón permite al integrador registrador Waters 745 calcular los RF y los RT medios para cada aminoácido.

La siguiente tabla es un ejemplo de tabla de calibración obtenida mediante el método descrito.

AMINOACIDO	FR	TR
Glutamato	1.081	5.25
Homoserina	0.000	****
GABA	1.244	14.61

3.3.2.3 Cálculo del coeficiente de variación.

Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectaron en el cromatógrafo Waters 600E de 5 a 10 alícuotas de la misma solución patrón. Puesto que estas inyecciones fueron realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas son reflejo de la variabilidad propia del método. Una

vez obtenidas las concentraciones de aminoácidos (en pmol/ μ l) de la solución patrón se hallaron las medias y los coeficientes de variación de los valores obtenidos para cada aminoácido. Los coeficientes de variación fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{coeficiente de variación} = \frac{\text{desviación típica}}{\text{media}} \times 100$$

El coeficiente de variación obtenido para cada aminoácido puede observarse en la siguiente tabla:

AMINOACIDO	Media	n	s	CV
Glutámico	7,226	6	0,098	1,35 %
GABA	5,038	7	0,124	2,45 %

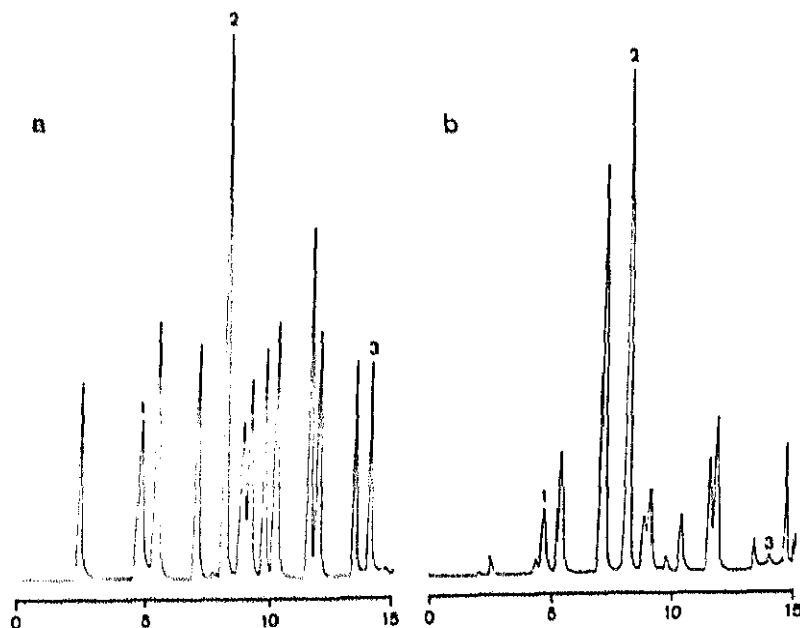


FIGURA 18: Ejemplo de cromatogramas obtenidos en las condiciones cromatográficas descritas en el texto: a) patrón; b) muestra obtenida de un animal mediante perfusión intracerebral *in vivo*. La escala representa el tiempo de análisis (en min). 1: GLU, 2: homoserina, 3: GABA.

3.3.2.4 Curva de linealidad.

La linealidad del método de análisis descrito ya ha sido mostrada previamente por otros autores para el rango de concentraciones usado (6.25 - 100 μM) (Lerma et al., 1986). A pesar de ello fue nuevamente determinada (fig. 19). Para calcular la linealidad de los experimentos se inyectaron en el cromatógrafo Waters 600E soluciones patrón con una concentración constante de homoserina (4 μl . de homoserina 0,05 mM = 102,56 pmoles) y concentraciones variables de los aminoácidos a analizar. La representación gráfica de la relación entre el área de cada aminoácido y el área del estándar interno en el eje de ordenadas y de la concentración de aminoácido en el eje de abscisas resultó ajustarse a una línea recta.

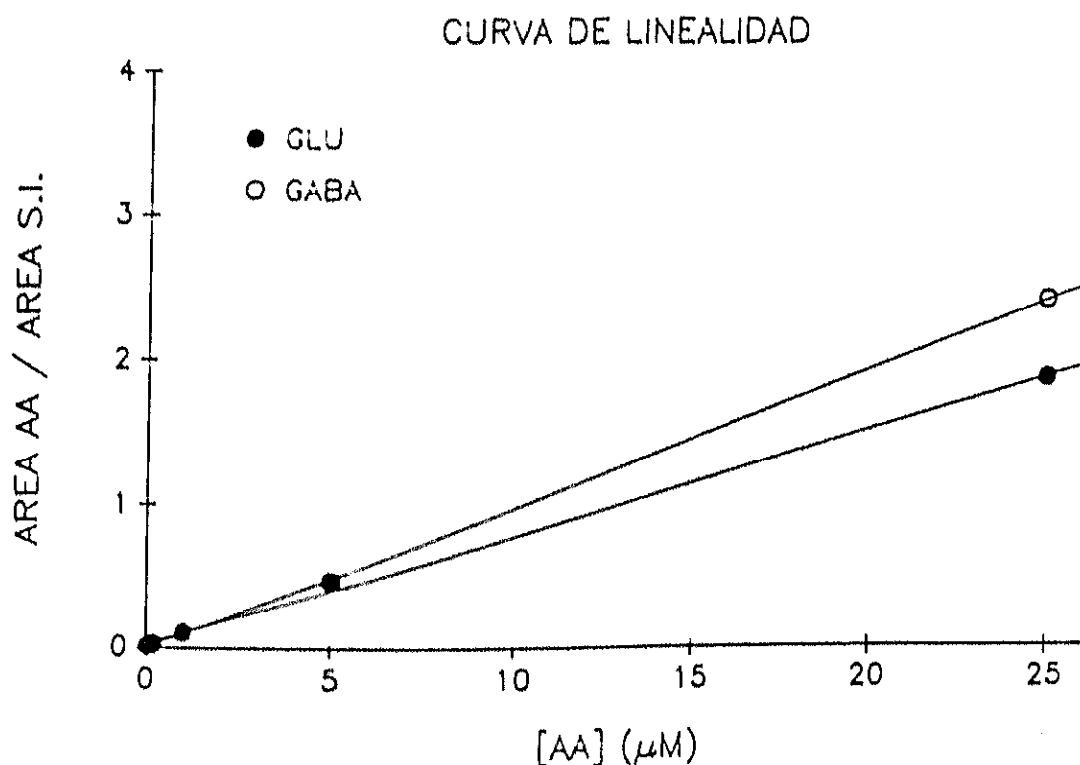


FIGURA 19: Curva de linealidad obtenida para los aminoácidos GLU y GABA bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto.

Materiales y Métodos

Estas condiciones cromatográficas permitieron analizar GLU y GABA, y se utilizaron en los bloques experimentales 2 y 3. Cuando se comenzaron los experimentos que conforman esta Tesis Doctoral, las condiciones cromatográficas variaban mínimamente a las aquí descritas. Concretamente para el análisis de las muestras del bloque experimental 1 las condiciones cromatográficas variaron en:

- el pH del tampón acetato 4M se ajustó a 5,85 en vez de a 5,65.
- la tabla de gradientes fue la siguiente:

TIEMPO(min)	FLUJO(ml/min)	%A	%B
0,00	1,00	90	10
5,00	1,00	90	10
3,00	1,00	52	48
5,00	1,00	38	62
5,01	1,00	0	10
9,00	1,00	0	10
19,01	1,00	90	10
23,00	1,00	90	10

Con estas condiciones fue posible analizar GLU pero no GABA. Posteriormente el método se perfeccionó a las condiciones cromatográficas descritas, de forma que el análisis permitió la identificación de GABA.

4.- HISTOLOGIA

Una vez finalizados los experimentos, se comprobó la correcta localización de las cánulas guía y *push-pull* mediante el estudio histológico de las piezas cerebrales.

El material empleado para dicha determinación histológica fue el siguiente:

- NaCl (Merck),
- formaldehído 35-40% (Panreac),
- heparina 5% (Leo),
- microtomo de congelación Leitz (Wetzlar),
- lupa binocular (Zeiss).

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de 2 ml/kg de Equithesin (ver composición en el apartado 2.3 de Material y Métodos). A continuación se perfundieron con solución salina isotónica (NaCl 0.9%) heparinizada al 1%, seguida de una solución de formaldehído al 10%. Terminada la perfusión, se extrajeron los cerebros con unos alicates planos y se mantuvieron a -4°C sumergidos en una solución de formaldehído al 10%.

Para su estudio histológico los cerebros fueron colocados en un microtomo de congelación y se cortaron en secciones de 100 μM . A continuación se comprobó la localización adecuada de las cánulas guía implantadas y del área de perfusión utilizando una lupa binocular.

5.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Los resultados se analizaron usando un análisis de la varianza de doble vía (ANOVA) seguido de un test de Dunnett. En todos los experimentos el test de Dunnett compara las medias de cada uno de los perfundidos (basales, estímulo y post-estímulo) con un control (Martín de Andrés y Luna del Castillo, 1990). En este caso fue tomado como control el perfundido anterior al estímulo.

RESULTADOS

BLOQUE EXPERIMENTAL. I

EFFECTO DE LA PERFUSION INTRACORTICAL DE NEUROTENSINA (10, 100 y 1000 nM) Y DE NEUROTENSINA (1000 nM) MAS LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE ALOPERIDOL (3 mg/kg) SOBRE LA CONCENTRACION EXTRACELULAR DE GLU EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL DE LA RATA DESPIERTA.

La perfusión intracortical de NT (10, 100 y 1000 nM) se realizó según el protocolo experimental 1 (pag. 73). La inyección i.p. de HL (3mg/kg) más la perfusión intracortical de NT (1000 nM) se realizó según el protocolo experimental 4 (pag. 74).

La perfusión de NT, a las dosis estudiadas, no produjo ningún cambio comportamental observable en el animal. La inyección i.p. de HL produjo en el animal una inmovilidad cataleptica que se mantuvo durante toda la perfusión.

La localización histológica de las cánulas guía Intracerebrales tuvo comprendida entre los planos A 10500 μ y A 10050 μ (Konig y Klippel, 67). En la fig. 21, pag. 92, se muestra en una serie estereotáxica, dónde tuvo situada la punta de las cánulas *push-pull* en los animales estudiados en este experimento.

1.1 Acido glutámico.

Los efectos producidos tras la perfusión intracortical de NT (10, 100 y 1000 nM) y de NT (1000 nM) tras la inyección i.p. de HL (3mg/kg) sobre la [GLU] en la CPM de la rata, se recogen en la tabla 11. En la fig. 20a se muestran los efectos producidos sobre la [GLU], por la perfusión de NT (10, 100 y 1000 nM). En la fig. 20b se muestran los efectos producidos sobre la [GLU], por la perfusión intracortical de NT (1000 nM) tras la inyección i.p de HL (3 mg/kg) .

La NT a la dosis de 1000 nM, produjo un aumento significativo (ANOVA) ($p < 0.05$) de la [GLU], en la CPM de la rata. Dicha significación se alcanzó en el perfundido donde se introduce la droga (p6). Cuando previamente se inyectó HL (3mg/kg) i.p., NT no produjo ningún cambio significativo sobre la [GLU]. Así mismo, HL no produjo variaciones significativas sobre la [GLU].

La NT a la dosis de 100 y 10 nM no produjo ningún cambio significativo sobre la [GLU] en la CPM de la rata.

ACIDO GLUTAMICO

tiempo p	NT 10nM n=7			NT 100nM n=7			NT 1000nM n=6			NT 1000 nM + HL3mg/kg n=5		
	x	KSM	P	x	KSM	P	x	ESM	P	x	ESM	P
0-10 (p1)	0,33	0,06	-	0,32	0,04	-	0,46	0,08	-	0,41	0,08	-
10-20 (p2)	0,26	0,06	-	0,25	0,05	-	0,36	0,05	-	0,35	0,07	-
20-30 (p3)	0,21	0,02	-	0,30	0,02	-	0,31	0,04	-	0,18	0,03	-
30-40 (p4)	0,32	0,06	-	0,34	0,03	-	0,33	0,05	-	0,38	0,05	-
40-50 (p5)	0,29	0,04	-	0,30	0,03	-	0,41	0,11	-	0,37	0,05	-
50-60 (p6)	0,29	0,05	-	0,40	0,10	-	0,63	0,12	.05	0,36	0,08	-
60-70 (p7)	0,21	0,02	-	0,33	0,04	-	0,55	0,17	-	0,35	0,08	-
70-80 (p8)	0,19	0,03	-	0,30	0,03	-	0,32	0,03	-	0,34	0,06	-
80-90 (p9)	0,21	0,02	-	0,29	0,05	-	0,34	0,05	-	0,35	0,03	-
90-100 (p10)	0,33	0,06	-	0,30	0,05	-	0,40	0,04	-	0,38	0,08	-

TABLA 11: Efecto de la NT (10, 100 y 1000 nM) y de NT (1000 nM) + HL (3mg/kg) sobre [GLU] en la CPM de la rata. Datos expresados en valores absolutos (pmoles de AA/ μ l de perfundido). x: media, ESM: error estandar de la media, n: número de animales, p: perfundidos, t: tiempo, P: significación estadística.

GLUTAMATO (CPM)

Resultados

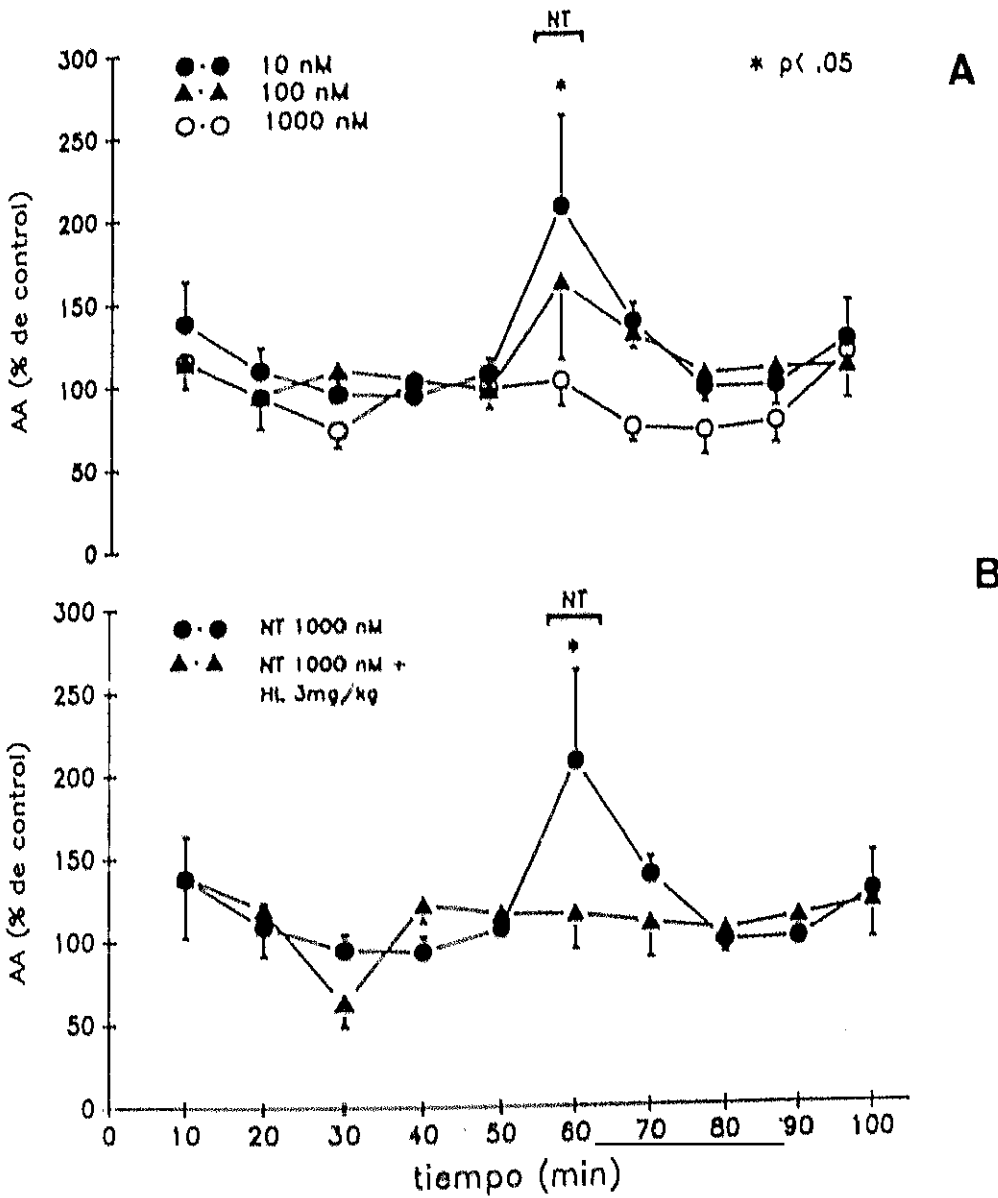


FIGURA 20: Representación de los tantos por ciento respecto al control los datos expresados en la tabla 1. a) Efecto de la perfusión intracortical de NT (10, 100, 1000 nM) sobre la [GLU] en la CPM de la rata. b) efecto de la perfusión intracortical de NT (1000 nM) tras la inyección i.p. de HL (3mg/kg) sobre la [GLU] en la CPM de la rata. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo (p3, p4, p5). En el eje de abscisas se indica el tiempo. En el eje de ordenadas se representan los porcentajes. Las líneas verticales representan el valor estándar de la media.

Resultados

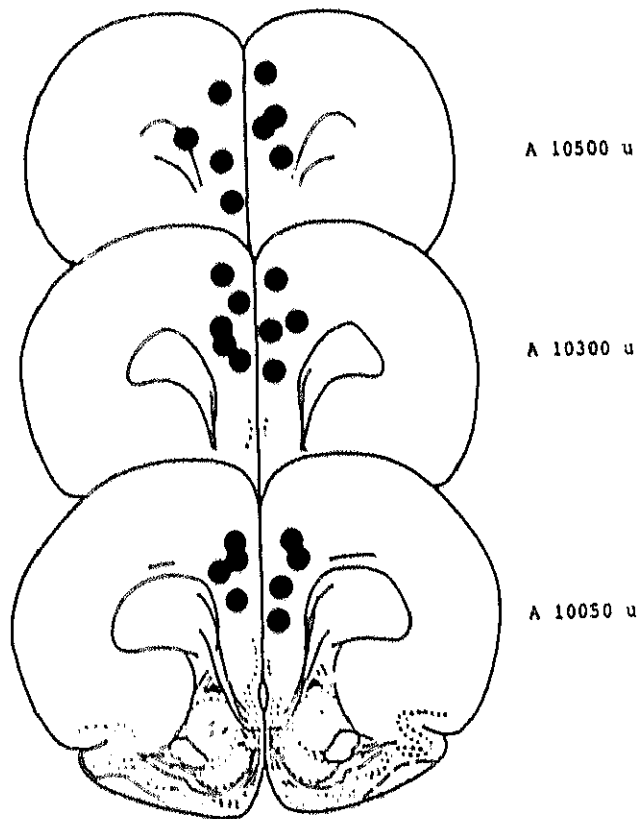


FIGURA 21: Localización histológica de la punta de las cánulas *push-pull* en los animales utilizados en el bloque experimental 1.

BLOQUE EXPERIMENTAL 2

EFFECTO DE LA PERFUSION INTRACORTICAL DE APOMORFINA (5, 10 y 20 μM) Y DE APOMORFINA (10 μM) MAS LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE HALOPERIDOL (3 mg/kg) SOBRE LA CONCENTRACION EXTRACELULAR DE GLU y GABA EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL DE LA RATA DESPIERTA

La perfusión de APO (5, 10 y 20 μM) se realizó según el protocolo experimental 1 (pag. 73). La inyección i.p. de HL (3mg/kg) más la perfusión intracortical de APO (10 μM) se realizó según el protocolo experimental 3 (pag. 74).

La perfusión intracortical de APO a las dosis estudiadas, no produjo ningún cambio conductual observable en el animal. La inyección de HL (i.p.) produjo en el animal una inmovilidad cataleptica que se mantiene durante toda la perfusión.

La localización histológica de las cánulas guía intracerebrales estuvo comprendida entre los planos A 10500 μ y A 10050 μ (Konig y Klippel, 1967). En la fig. 24. (pag. 100) se muestra en una serie estereotáxica, dónde estuvo situada la punta de la cánulas *push-pull* en los animales estudiados en este bloque experimental.

2.1 Acido glutámico

Los efectos producidos por la perfusión intracortical de APO (5, 10 y 20 μ M) y por la perfusión intracortical de APO (10 μ M) tras la inyección i.p. de HL, sobre la [GLU] en la CPM de la rata, se recogen en la tabla 12. La gráfica 22a muestran los efectos producidos sobre la [GLU], por la perfusión intracortical de APO (5, 10 y 20 μ M). En la gráfica 22b se muestran los efectos producidos sobre la [GLU], por la perfusión intracortical de APO (10 μ M) tras la inyección de HL (3 mg/kg) i.p.

APO a la dosis de 10 μ M produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GLU] ($p < .01$). Esta significación se alcanzó en el perfundido en el que se introdujo la droga (p6) y se mantuvo durante los 10 primeros minutos post-estimulo (p7). Cuando previamente se inyectó HL (3mg/kg) i.p., APO no produjo ningún cambio significativo sobre [GLU]. Así mismo, HL no produjo variaciones significativas sobre dicho aminoácido.

APO a las dosis de 5 y 20 μ M no produjo cambios significativos sobre la [GLU].

ACIDO GLUTAMICO

Tiempo	p	APO 5 μ M			APO 10 μ M			APO 20 μ M			APO 10 μ M + HL. 3mg/kg n=6		
		x	KSM	P	x	KSM	P	x	KSM	P	x	KSM	P
0-10	(p1)	0.30	0.04	-	0.27	0.05	-	0.31	0.03	-	0.23	0.05	-
10-20	(p2)	0.24	0.03	-	0.25	0.04	-	0.28	0.05	-	0.19	0.03	-
20-30	(p3)	0.28	0.04	-	0.29	0.05	-	0.34	0.05	-	0.20	0.04	-
30-40	(p4)	0.27	0.05	-	0.27	0.06	-	0.36	0.06	-	0.22	0.04	-
40-50	(p5)	0.25	0.03	-	0.28	0.04	-	0.26	0.04	-	0.20	0.04	-
50-60	(p6)	0.32	0.06	-	0.46	0.09	.01	0.32	0.06	-	0.25	0.07	-
60-70	(p7)	0.33	0.08	-	0.45	0.08	.01	0.37	0.10	-	0.28	0.10	-
70-80	(p8)	0.31	0.06	-	0.34	0.08	-	0.31	0.08	-	0.24	0.07	-
80-90	(p9)	0.28	0.06	-	0.30	0.06	-	0.30	0.05	-	0.25	0.07	-
90-100	(p10)	0.30	0.05	-	0.31	0.05	-	0.35	0.12	-	0.21	0.04	-

TABLA 12: Efecto de la perfusión de APO (5, 10 y 20 μ M) y de APO (10 μ M) mas HL. (3mg/kg) sobre [GLU] en la CPM. Datos expresados en valores absolutos (pmoles AA/pl de perfundido). x:media, ESM:error estándar de la media, n:número de animales, p:perfundidos, t:tiempo, P:significación estadística.

GLUTAMATO (CPM)

Resultados

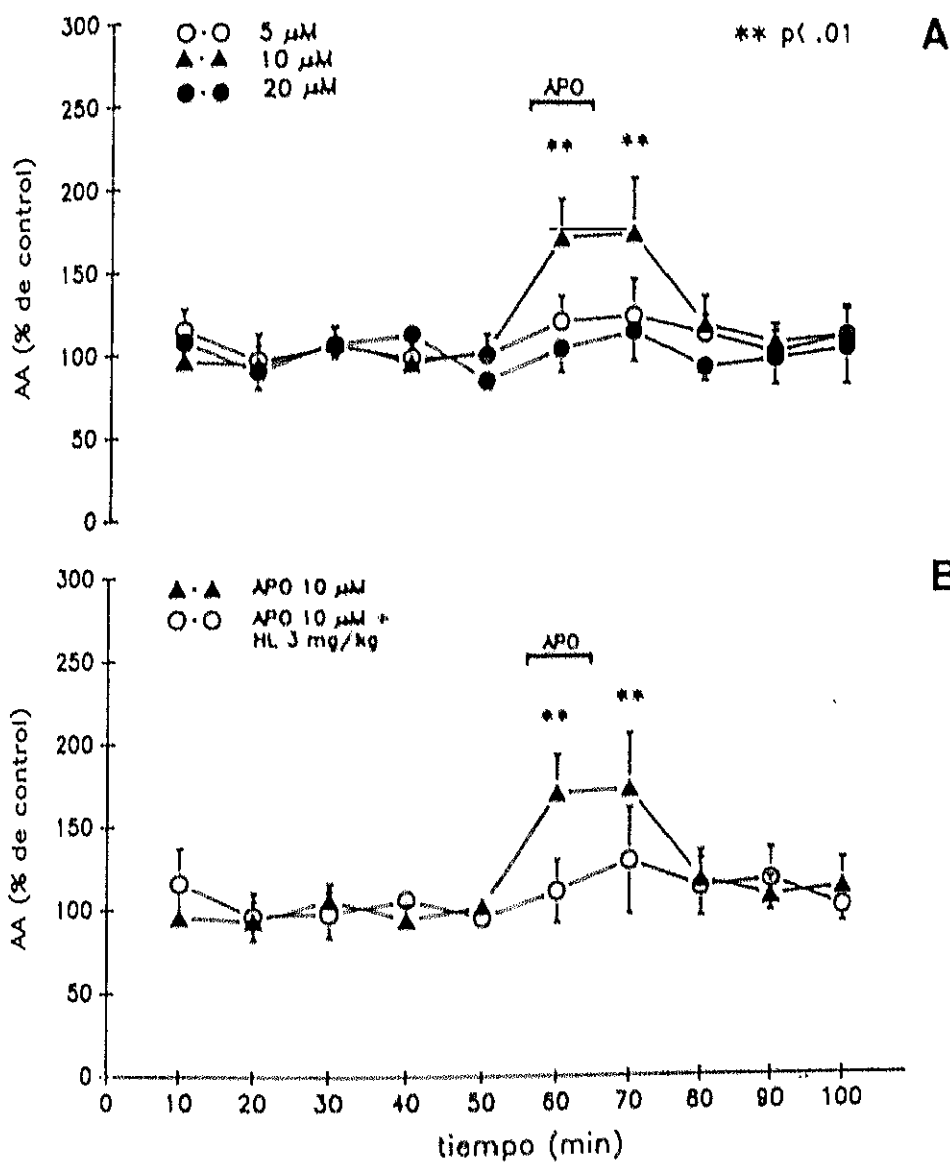


FIGURA 22: Representación en tantos por ciento respecto al control de los datos expresados en la tabla 12. a) Efecto de la perfusión intracortical de APO (5, 10 y 20 μM) sobre la [GLU] en la CPM de la rata. b) efecto de la perfusión intracortical de APO (3 μM) tras la inyección i.p. de HL (3mg/kg) sobre la [GLU] en la CPM de la rata. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo (p3-p4-p5). En el eje de abscisas se indica el tiempo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

2.2 GABA.

Los efectos producidos tras la perfusión intracortical de APO (5, 10 y 20 μM) y por la perfusión intracortical de APO (10 μM) tras la inyección i.p. de HL, sobre la [GABA] en la CPM de la rata, se recogen en la tabla 13. En la fig 23a se muestran los efectos producidos sobre la [GABA] tras la perfusión intracortical de APO (5, 10 y 20 μM). En la fig 23b se muestran los efectos producidos sobre la [GABA] por la perfusión intracortical de APO (10 μM) tras la inyección de HL (3 mg/kg) i.p..

APO a la dosis de 20 y 10 μM produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GABA] ($p < .05$). Esta significación se alcanzó en el perfundido en el que se introdujo la droga ($p6$). Cuando previamente se inyectó HL (3mg/kg) i.p., APO (10 μM) no produjo ningún cambio significativo sobre la [GABA]. Así mismo, HL no produjo variaciones significativas sobre dicho aminoácido.

APO a la dosis de 5 μM no produjo cambios significativos sobre la [GABA].

GABA

tiempo	APO 5 μM				APO 10 μM				APO 20 μM				APO 10 μM + HL 3mg/kg			
	p	x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P
0-10 (p1)	0,03	0,003	-	0,04	0,011	-	0,03	0,005	-	0,03	0,005	-	0,03	0,005	-	
0-20 (p2)	0,02	0,003	-	0,03	0,007	-	0,03	0,006	-	0,03	0,005	-	0,03	0,005	-	
0-30 (p3)	0,02	0,004	-	0,04	0,012	-	0,03	0,007	-	0,03	0,004	-	0,03	0,004	-	
0-40 (p4)	0,03	0,010	-	0,04	0,014	-	0,04	0,008	-	0,03	0,004	-	0,03	0,004	-	
0-50 (p5)	0,04	0,009	-	0,03	0,009	-	0,03	0,003	-	0,02	0,003	-	0,02	0,003	-	
0-60 (p6)	0,04	0,019	-	0,05	0,012	.05	0,05	0,019	.05	0,03	0,006	-	0,03	0,006	-	
0-70 (p7)	0,03	0,008	-	0,04	0,009	-	0,03	0,009	-	0,02	0,002	-	0,02	0,002	-	
0-80 (p8)	0,03	0,010	-	0,04	0,008	-	0,03	0,007	-	0,02	0,005	-	0,02	0,005	-	
0-90 (p9)	0,04	0,017	-	0,04	0,011	-	0,03	0,006	-	0,03	0,009	-	0,03	0,009	-	
-100 (p10)	0,02	0,004	-	0,03	0,005	-	0,03	0,007	-	0,02	0,004	-	0,02	0,004	-	

TABLA 13: Efecto de la perfusión de APO (5, 10 y 20 μM), y de APO (10 μM) más HL (3mg/kg) sobre la [GABA] en la CPM de la rata. Datos expresados en valores absolutos (pmoles GABA/ μl de perfundido). x: media, ESM: error estándar de la media, n: número de animales, p:perfundidos, t: tiempo, P: significación estadística.

GABA (CPM)

Resultados

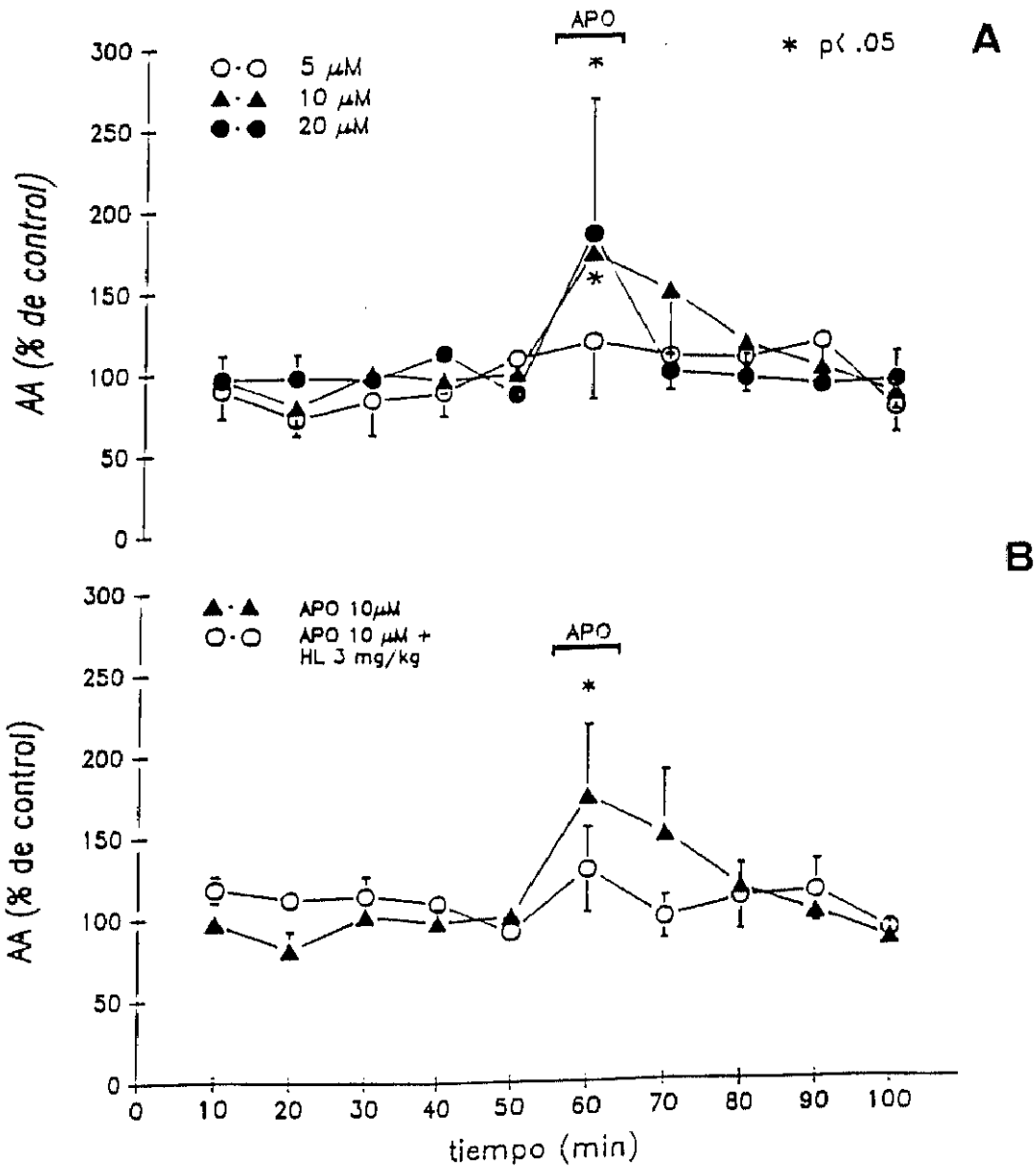


FIGURA 23: Representación en tantos por ciento respecto al control de los datos expresados en la tabla 13. a) Efecto de la perfusión intracortical de APO (5, 10 y 20 μM) sobre la [GABA] en la CPM de la rata. b) efecto de la perfusión intracortical de APO (10 μM) tras la inyección i.p. de HL (3mg/kg) sobre la [GABA] en la CPM de la rata. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo (p3-p4-p5). En el eje de abscisas se indica el tiempo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

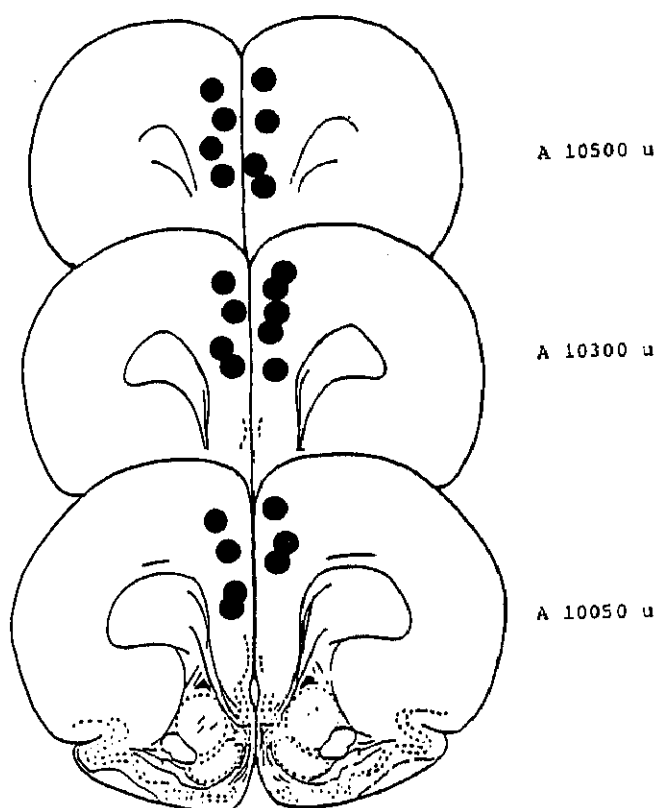


FIGURA 24: Localización histológica de la punta de las cánulas *push-pull* en los animales utilizados en el bloque experimental 2.

BLOQUE EXPERIMENTAL 3

EFFECTO DE LA PERFUSION DE AGONISTAS/ANTAGONISTAS MUSCARINICOS SOBRE LA [CONCENTRACION EXTRACELULAR DE GLU Y GABA EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL DE LA RATA DESPIERTA

Este bloque experimental se puede dividir en tres experimentos:

3.1 Efecto de la perfusión intracortical de ARIE a las dosis de 50, 100 y 200 mM sobre la [GLU] y la [GABA] en la CPM de la rata despierta.

3.2 Efecto de la inyección i.p de OXO a las dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg sobre la [GLU] y la [GABA] en la CPM de la rata despierta.

3.3 Efecto de la perfusión intracortical de McN-A-343 (McN) a las dosis de 1, 10 y 100 μ M y de McN-A-343 (10 μ M) tras la perfusión intracortical de PZ (100 μ M) sobre la [GLU] y la [GABA] en la CPM de la rata despierta.

3.1 EFECTO DE LA PERFUSION INTRACORTICAL DE ARECOLINA A LAS DOSIS DE 50, 100 Y 200 μ M SOBRE LA CONCENTRACION EXTRACELULAR DE GLU y GABA EN LA CORTIZA PREFRONTAL MEDIAL DE LA RATA DESPIERTA.

La perfusión de ARE se realizó según el protocolo experimental 1 (pag. 74).

La perfusión intracortical de ARE, a las dosis estudiadas produjo en animal una conducta de acicalamiento, así como un aumento de la actividad motora. Esta conducta permanece durante el tiempo que se está perfundiendo la droga (p6).

La localización histológica de las cánulas guía intracerebrales estuvo comprendida entre los planos A 10500u y A 10050u (Konig and Klippel, 1967). En la fig. 27 (pag. 109) se muestra en una serie estereotáctica, dónde estuvo situada la punta de la cánulas *push-pull* en los animales estudiados en este experimento.

3.1.1. Acido glutámico

Los efectos producidos por la perfusión intracortical de ARE (50, 100 y 200 mM) sobre la [GLU] en la CPM de la rata despierta, se recogen en la tabla 14, fig. 25.

ARR, a la dosis de 200 mM, produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GLU] ($p < .01$). Esta significación se alcanzó en el perfundido en el que se introduce la droga (p6) y se mantuvo durante los 10 primeros minutos post-estimulo (p7).

ARR, a la dosis de 100 mM, produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GLU] ($p < .01$). Esta significación se alcanzó en el perfundido en el que se introduce la droga (p6).

ARR, a la dosis de 50 mM, no produjo ninguna variación significativa sobre [GLU].

ACIDO GLUTAMICO

tiempo	p	ARE 50 mM n=4			ARE 100 mM n=9			ARE 200 mM n=7		
		x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P
0-10	(p1)	0,31	0,07	-	0,31	0,04	-	0,37	0,05	-
10-20	(p2)	0,31	0,06	-	0,27	0,04	-	0,40	0,07	-
20-30	(p3)	0,28	0,05	-	0,37	0,07	-	0,31	0,05	-
30-40	(p4)	0,30	0,06	-	0,36	0,05	-	0,37	0,04	-
40-50	(p5)	0,30	0,05	-	0,34	0,09	-	0,30	0,04	-
50-60	(p6)	0,38	0,04	-	0,63	0,12	.01	0,61	0,03	.01
60-70	(p7)	0,24	0,06	-	0,47	0,08	-	0,62	0,09	.01
70-80	(p8)	0,31	0,08	-	0,33	0,06	-	0,34	0,07	-
80-90	(p9)	0,31	0,07	-	0,33	0,05	-	0,37	0,07	-
0-100	(p10)	0,23	0,06	-	0,40	0,06	-	0,32	0,05	-

TABLA 14: Efecto de ARE, a las dosis de 50, 100 y 200 mM sobre [GLU] en la CPM de la rata. Datos expresados en valores absolutos (pmoles AA/ μ l de Perfundido). x: media, ESM: error estándar de la media, n: número de animales, p:perfundido, t: tiempo, P: significación estadística.

GLUTAMATO (CPM)

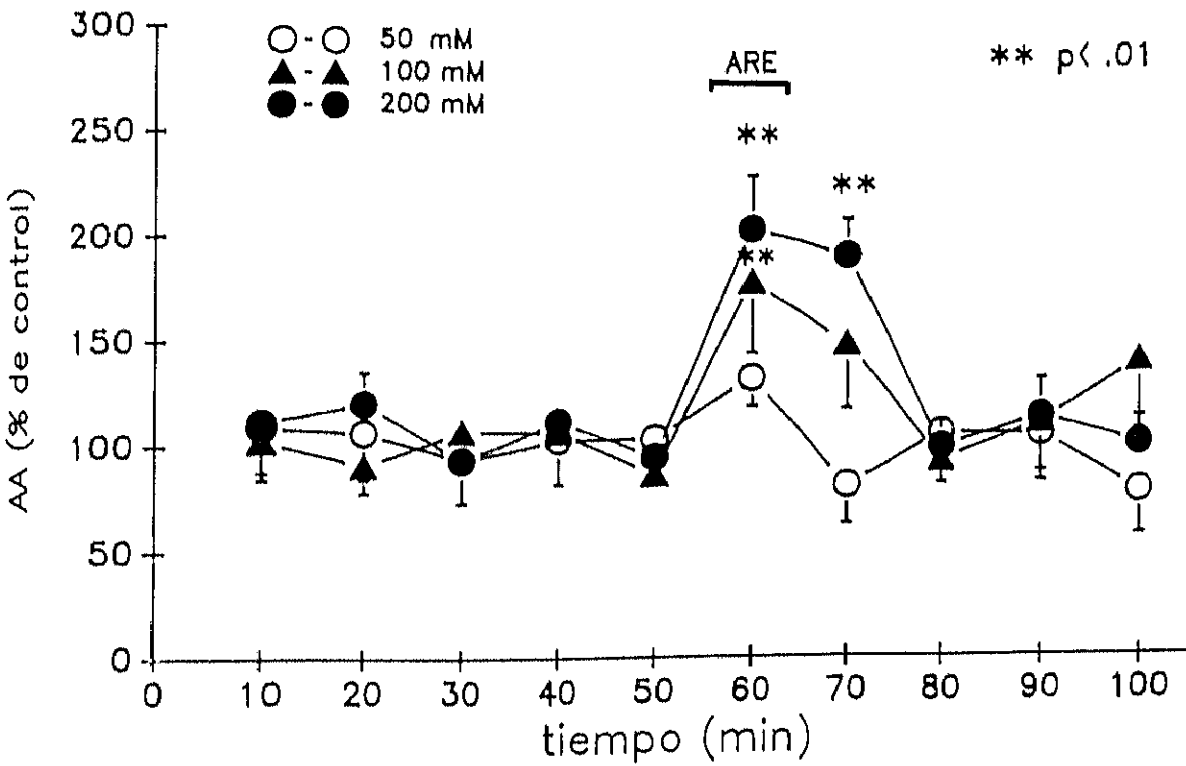


FIGURA 25: Representación en tantos por ciento respecto al control de los datos expresados en la tabla 14. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo (p3-p4-p5). En el eje de abscisas se indica el tiempo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

3.1.2 GABA

Los efectos producidos por la perfusión intracortical de ARE (50, 100 y 200 mM), sobre la [GABA] en la CPM de la rata despierta, se recogen en la tabla 15, fig. 26.

ARE, a la dosis de 200 mM, produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GABA] ($p < .01$). Esta significación se alcanzó en el perfundido en el que se introduce la droga (p6) y se mantuvo durante el p7.

ARE, a la dosis de 100 mM, produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GABA] ($p < .01$). Las [GABA] alcanzaron significación estadística en el perfundido en el que se introdujo la droga (p6).

ARE, a la dosis de 50 mM, produjo un aumento significativo (ANOVA) ($p < .05$) sobre la [GABA] durante el perfundido en el que se introdujo la droga (p6).

GABA

tiempo p	ARE 50 mM n=4			ARE 100 mM n=4			ARE 200 mM n=5		
	x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P
0-10 (p1)	0,04	0,015	-	0,02	0,001	-	0,02	0,003	-
10-20 (p2)	0,03	0,010	-	0,02	0,002	-	0,03	0,006	-
20-30 (p3)	0,03	0,004	-	0,02	0,001	-	0,02	0,004	-
30-40 (p4)	0,03	0,004	-	0,02	0,001	-	0,03	0,005	-
40-50 (p5)	0,03	0,004	-	0,02	0,001	-	0,02	0,003	-
50-60 (p6)	0,05	0,007	.05	0,04	0,017	.01	0,08	0,005	.01
60-70 (p7)	0,03	0,005	-	0,02	0,005	-	0,06	0,010	.01
70-80 (p8)	0,03	0,004	-	0,02	0,002	-	0,04	0,008	-
80-90 (p9)	0,03	0,005	-	0,02	0,002	-	0,02	0,005	-
90-100 (p10)	0,02	0,004	-	0,02	0,001	-	0,03	0,005	-

TABLA 15: Efecto de la perfusión intracortical de ARE (50, 100 y 200 mM) sobre [GABA] en la CPM. Datos expresados en valores absolutos (pmoles AA/ μ l de perfundido). x: media, ESM: error estándar de la media, n: número de animales, p: perfundidos, t: tiempo, P: significación estadística.

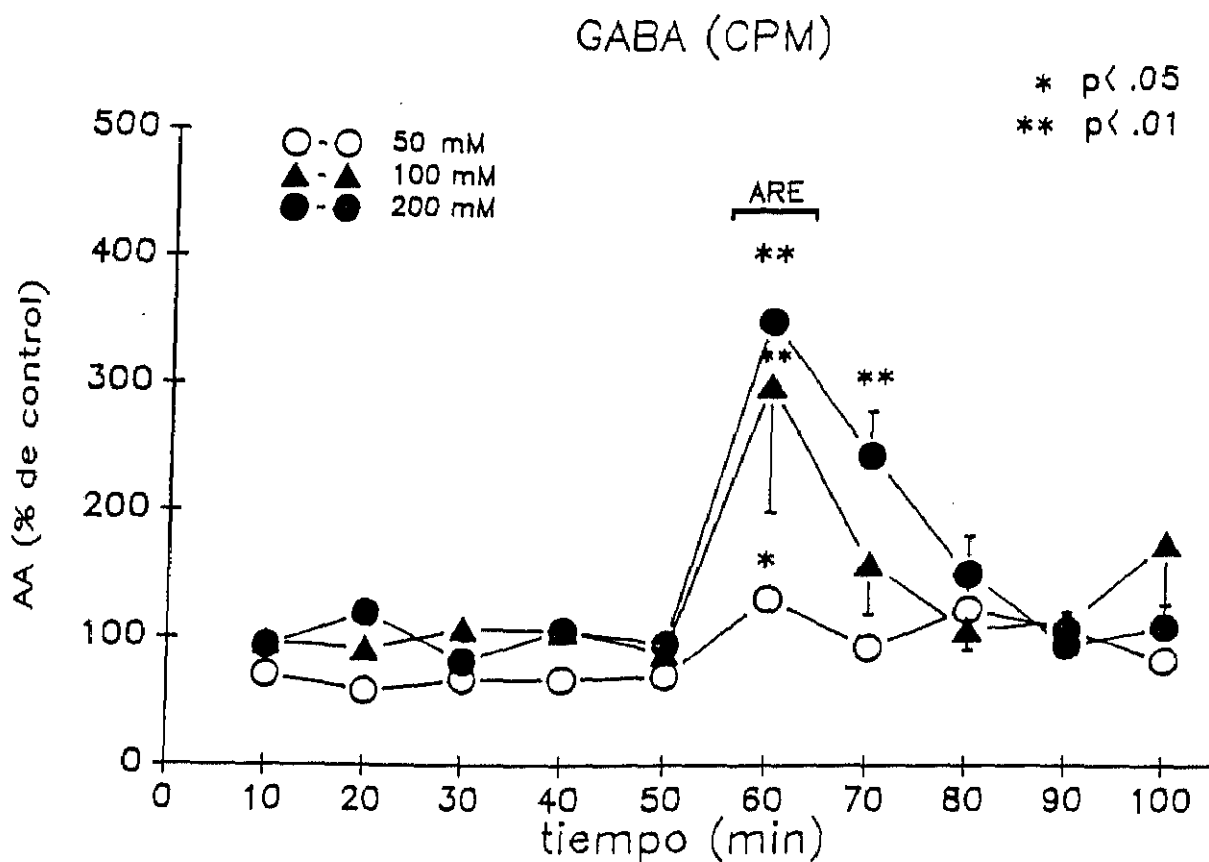


FIGURA 26: Representación en tantos por ciento respecto al control de los datos expresados en la tabla 15. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo (p3-p4-p5). En el eje de abscisas se indica el tiempo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

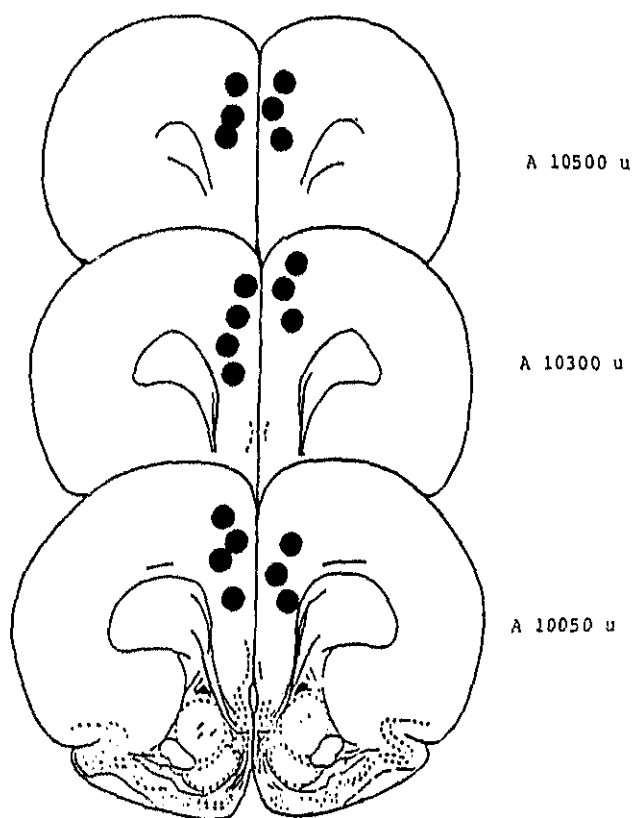


FIGURA 27: Localización histológica de la punta de las cánulas *push-pull* en los animales utilizados en el experimento 3.1.

3.2 EFECTO DE LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE OXOTREMORINA (0,5; 1 y 2 mg/kg) SOBRE LA CONCENTRACION EXTRACELULAR DE GLU y GABA EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL DE LA RATA DESPIERTA.

Dicho experimento se realizó según el protocolo experimental 3 (pag. 74).

La inyección i.p. de OXO produjo en el animal lacrimeo, salivación, diarrea, temblores y en algunas ocasiones convulsiones. Estos síntomas aparecieron a los pocos minutos de la inyección de la droga, y se prolongaron, aproximadamente, entre 40-60 minutos, según las dosis utilizadas.

La localización histológica de las cánulas guía intracerebrales estuvo comprendida entre los planos A 10500 μ y A 10050 μ (Konig and Klippel, 1967). En la fig. 30 (pag. 117) se muestra en una serie estereotáxica, dónde estuvo situada la punta de la cánulas *push-pull* en los animales estudiados en este experimento.

3.2.1 Acido glutámico

Los efectos producidos sobre la [GLU] en la CPM de la rata despierta, tras la inyección i.p. de OXO (0.5, 1 y 2 mg/kg), se recogen en la tabla 16, fig. 28.

OXO no produjo variación significativa sobre la [GLU] a ninguna de las dosis estudiadas.

ACIDO GLUTAMICO

tiempo	p	OXO 0,5 mg/kg n=4			OXO 1 mg/kg n=8			OXO 2 mg/kg n=5		
		x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P
0-10	(p1)	0,48	0,06	-	0,46	0,08	-	0,28	0,03	-
10-20	(p2)	0,47	0,06	-	0,54	0,10	-	0,30	0,01	-
20-30	(p3)	0,51	0,08	-	0,43	0,04	-	0,29	0,03	-
30-40	(p4)	0,60	0,04	-	0,39	0,06	-	0,28	0,05	-
40-50	(p5)	0,37	0,08	-	0,46	0,07	-	0,26	0,04	-
50-60	(p6)	0,40	0,04	-	0,36	0,05	-	0,23	0,02	-
60-70	(p7)	0,37	0,03	-	0,42	0,09	-	0,25	0,02	-
70-80	(p8)	0,48	0,10	-	0,32	0,05	-	0,24	0,03	-
80-90	(p9)	0,44	0,07	-	0,37	0,04	-	0,26	0,03	-
90-100	(p10)	0,58	0,13	-	0,45	0,05	-	0,27	0,04	-

TABLA 16: Efecto de la inyección i.p de OXO, a las dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg sobre la [GLU] en la CPM de la rata. Datos expresados en valores absolutos (pmoles AA/ μ l de perfundido). x: media, ESM: error estándar de la media, n: número de animales, p: perfundidos, t: tiempo, P: significación estadística.

GLUTAMATO (CPM)

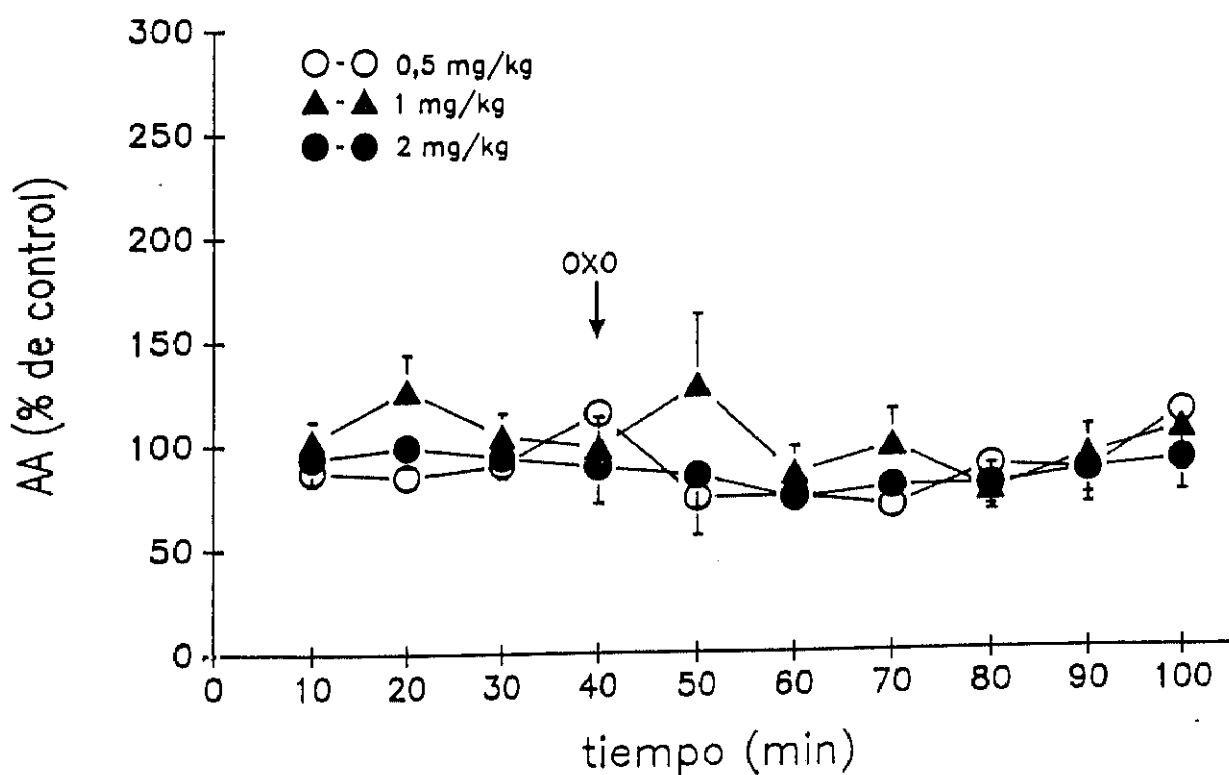


FIGURA 28: Representación en tantos por ciento respecto al control de los datos expresados en la tabla 16. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo (p1-p2-p3). En el eje de abscisas se indica el tiempo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

3.2.2 GABA

Los efectos producidos por la inyección i.p. de OXO (0,5, 1 y 2 mg/kg), sobre la [GABA] en la CPM de la rata despierta, se recogen en la tabla 17, fig. 29.

OXO no produjo variaciones significativas sobre la [GABA] a ninguna de las dosis estudiadas.

GABA

tiempo p	OXO 0,5 mg/kg n=3			OXO 1 mg/kg n=8			OXO 2 mg/k n=5		
	x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P
0-10 (p1)	0,04	0,01	-	0,03	0,01	-	0,04	0,01	-
10-20 (p2)	0,04	0,01	-	0,04	0,01	-	0,04	0,00	-
20-30 (p3)	0,04	0,01	-	0,03	0,00	-	0,05	0,01	-
30-40 (p4)	0,04	0,01	-	0,03	0,00	-	0,04	0,01	-
40-50 (p5)	0,04	0,02	-	0,04	0,01	-	0,03	0,01	-
50-60 (p6)	0,04	0,01	-	0,03	0,00	-	0,03	0,01	-
60-70 (p7)	0,03	0,00	-	0,02	0,00	-	0,03	0,00	-
70-80 (p8)	0,03	0,00	-	0,03	0,01	-	0,04	0,01	-
80-90 (p9)	0,05	0,02	-	0,02	0,00	-	0,04	0,01	-
90-100 (p10)	0,04	0,00	-	0,03	0,00	-	0,03	0,00	-

TABLA 17: Efecto de la inyección i.p de OXO (0,5, 1 y 2 mg/kg) sobre [GABA] en la CPM de la rata. Datos expresados en valores absolutos (pmoles AA/ μ l de perfundido). x: media, ESM: error estándar de la media, n: número de animales, p: perfundidos, t: tiempo, P: significación estadística.

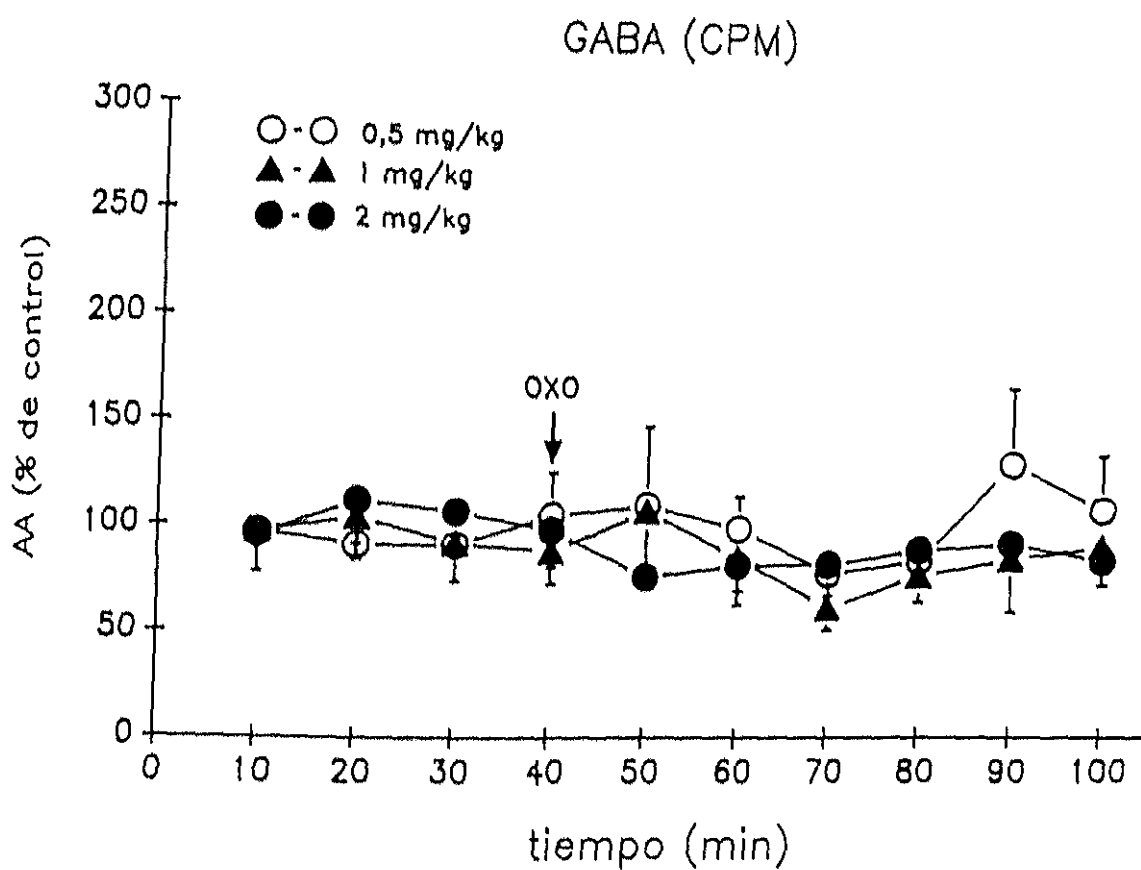


FIGURA 29: Representación en tantos por ciento respecto al control de los datos expresados en la tabla 17. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo (p1-p2-p3). En el eje de abscisas se indica el tiempo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

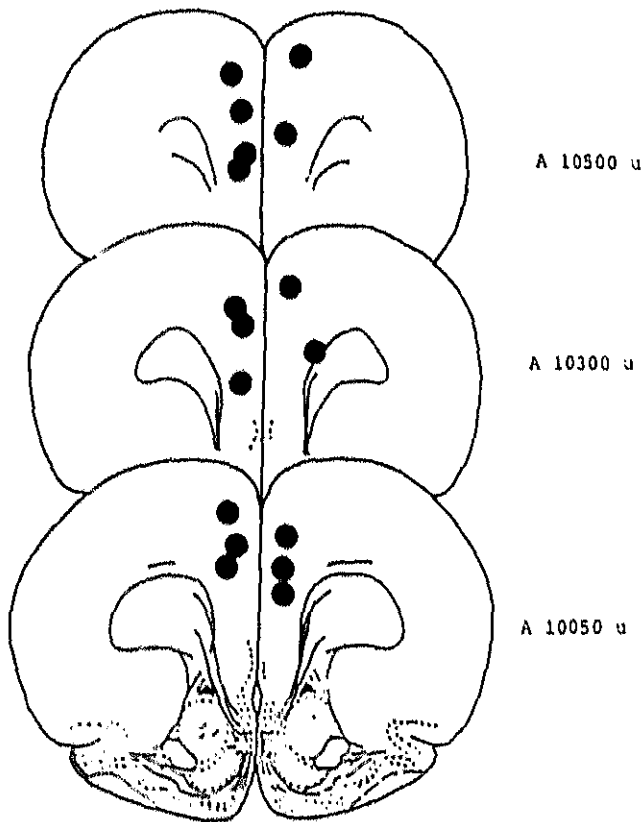


FIGURA 30: Localización histológica de la punta de las cánulas *push-pull* en los animales utilizados en el experimento 3.2.

3.3 EFECTO DE LA PERFUSION INTRACORTICAL DE McN-A-343 (1, 10 y 100 μM) Y DE McN-A-343 (10 μM) TRAS LA PERFUSION INTRACORTICAL DE PIRENZEPINA (100 μM) SOBRE LA CONCENTRACION EXTRACELULAR DE GLU Y GABA EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL DE LA RATA DESPIERTA.

La perfusión de McN-A-343 (1, 10 y 100 μM) se realizó según el protocolo experimental 1 (pag 73). La perfusión de McN tras la previa perfusión de PZ (100 μM) se realizó según el protocolo experimental 2 (pag. 73).

La perfusión intracortical de McN-A-343 (McN) (1, 10 y 100 μM) así como la perfusión intracortical de PZ (100 μM) no produjo cambios comportamentales observables en el animal.

La localización histológica de las cánulas guía intracerebrales estuvo comprendida entre los planos A 10500 μ y A 10050 μ (Konig and Klippel, 1967). En la fig. 33 (pag. 125) se muestra en una serie estereotáxica, dónde estuvo situada la punta de la cánulas *push-pull* en los animales estudiados en este experimento.

3.3.1 Acido glutámico

Los efectos producidos tras la perfusión intracortical de McN (1, 10 y 100 μM) y por la perfusión intracortical de McN (10 μM) tras la perfusión de PZ, sobre la [GLU] en la CPM de la rata, se recogen en la tabla 18. La figura 31a muestra los efectos producidos sobre la [GLU] por la perfusión intracortical de McN (1, 10 y 100 μM). En la figura 31b se muestran los efectos producidos sobre la [GLU] por la perfusión intracortical de McN (10 μM) tras la previa perfusión de PZ (100 μM).

McN a la dosis de 100 μM produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GLU] ($p < .05$). Esta significación se alcanzó en el perfundido en el que se introdujo la droga ($p6$).

McN a la dosis de 10 μM produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GLU] ($p < .01$). Esta significación se alcanzó en el perfundido en el que se introdujo la droga ($p6$). Cuando, previamente se perfundió PZ (100 μM) intracortical, McN (10 μM) no produjo ningún cambio significativo sobre la [GLU]. Así mismo PZ no produjo variaciones significativas sobre dichos aminoácidos.

McN a la dosis de 1 μM produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre la [GLU] ($p < .01$). Esta significación se alcanzó en el perfundido en el que se introdujo la droga ($p6$).

ACIDO GLUTAMICO

Tiempo	p	McN 1 uM n=6			McM 10 uM n=5			McN 100 uM n=5			McN 10 uM+ PZ 100 uM n=5		
		x	BSM	P	x	BSM	P	x	ESM	P	x	BSM	P
0-10	(p1)	0,46	0,08	-	0,34	0,03	-	0,51	0,04	-	0,47	0,07	-
10-20	(p2)	0,43	0,07	-	0,34	0,04	-	0,42	0,05	-	0,44	0,08	-
20-30	(p3)	0,53	0,06	-	0,30	0,02	-	0,36	0,04	-	0,51	0,10	-
30-40	(p4)	0,38	0,05	-	0,29	0,03	-	0,38	0,05	-	0,60	0,14	-
40-50	(p5)	0,38	0,08	-	0,40	0,09	-	0,38	0,06	-	0,48	0,08	-
50-60	(p6)	0,74	0,17	.01	0,54	0,09	.01	0,52	0,11	.05	0,47	0,08	-
60-70	(p7)	0,29	0,08	-	0,41	0,02	-	0,48	0,04	-	0,40	0,08	-
70-80	(p8)	0,38	0,05	-	0,38	0,04	-	0,43	0,06	-	0,46	0,10	-
80-90	(p9)	0,45	0,08	-	0,40	0,03	-	0,41	0,05	-	0,45	0,09	-
90-100	(p10)	0,33	0,05	-	0,39	0,09	-	0,47	0,09	-	0,43	0,07	-

TABLA 18: Efecto de la McN-A-343 (1, 10 y 100 uM) y de McN (10µM) + PZ (100 µM) sobre [GLU] y en la CPM de la rata. Datos expresados en valores absolutos (pmoles GLU/ul de perfundido). x: media, ESM: error estándar de la media, n: número de animales, p:perfundidos, t: tiempo, P: significación estadística.

GLUTAMATO (CPM)

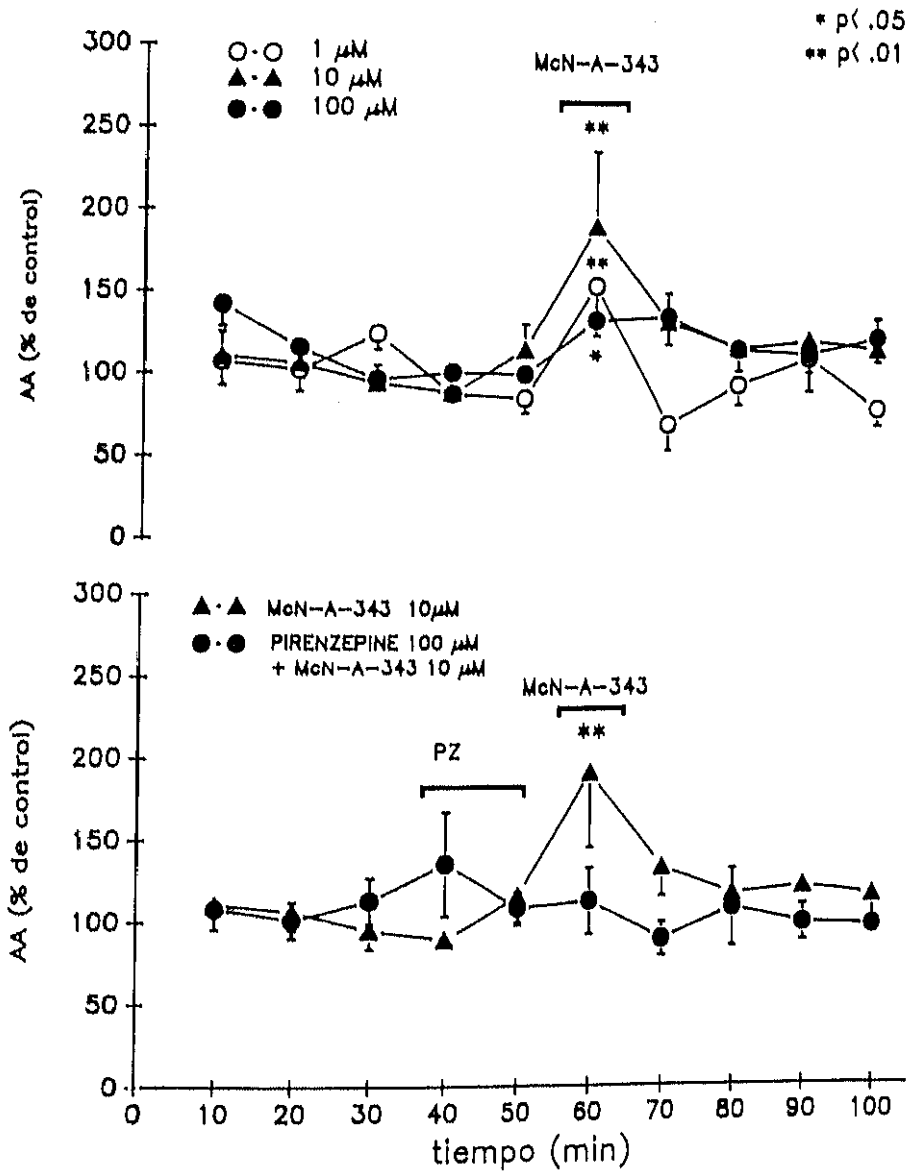


FIGURA 31: Representación en tantos por ciento respecto al control de los datos expresados en la tabla 18. a) Efecto de la perfusión intracortical de McN (1, 10 y 100 μM) sobre la [GLU] en la CPM de la rata. b) efecto de la perfusión intracortical de McN (10 μM) tras la perfusión PZ (100 μM) sobre la [GLU] en la CPM de la rata. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo. En el eje de abcisas se indica el tiempo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

3.3.2 GABA

Los efectos producidos por la perfusión intracortical de McN (1, 10 y 100 μM) y por la perfusión intracortical de McN (10 μM) tras la perfusión de PZ, sobre la [GABA] en la CPM de la rata despierta, se recogen en la tabla 19. La figura 32a muestra los efectos producidos sobre la [GABA] por la perfusión intracortical de McN (1, 10 y 100 μM). En la figura 32b se muestran los efectos producidos sobre [GABA] por la perfusión intracortical de McN (10 μM) tras la perfusión de PZ (100 μM).

McN, a la dosis de 100 μM , no produjo ninguna variación significativa sobre [GABA].

McN, a la dosis de 10 μM , produjo un aumento significativo (ANOVA) sobre [GABA] ($p < .01$) durante el p6. Cuando previamente se perfundió PZ (100 μM) intracortical, McN no produjo ningún cambio significativo sobre [GABA]. Así mismo PZ no produjo variaciones significativas sobre los niveles basales de dicho aminoácido.

McN, a la dosis de 1 μM , no produjo ninguna variación significativa sobre [GABA].

GABA

tiempo	p	McN 1 uM			McM 10 uM			McN 100 uM			McN 10 uM + PZ 100 uM		
		x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P	x	ESM	P
0-10	(p1)	0,02	0,001	-	0,02	0,003	-	0,03	0,005	-	0,04	0,010	-
10-20	(p2)	0,02	0,002	-	0,02	0,002	-	0,03	0,007	-	0,03	0,008	-
20-30	(p3)	0,02	0,003	-	0,02	0,003	-	0,03	0,003	-	0,45	0,008	-
30-40	(p4)	0,02	0,001	-	0,03	0,002	-	0,02	0,004	-	0,35	0,008	-
40-50	(p5)	0,02	0,001	-	0,03	0,003	-	0,03	0,005	-	0,04	0,006	-
50-60	(p6)	0,02	0,003	-	0,06	0,015	.01	0,04	0,005	-	0,04	0,005	-
60-70	(p7)	0,02	0,003	-	0,03	0,010	-	0,04	0,006	-	0,04	0,007	-
70-80	(p8)	0,02	0,003	-	0,02	0,002	-	0,04	0,008	-	0,04	0,007	-
80-90	(p9)	0,02	0,002	-	0,02	0,003	-	0,03	0,002	-	0,04	0,005	-
90-100	(p10)	0,02	0,002	-	0,03	0,002	-	0,03	0,004	-	0,03	0,003	-

TABLA 19: Efecto de la perfusión de McN-A-343 (1, 10 y 100 uM) y de McN (10uM) tras la perfusión de PZ (100uM) sobre la [GABA] en la CPM de la rata. Datos expresados en valores absolutos (pmoles GABA/ μ l de perfundido). x: media, ESM: error estándar de la media, n: número de animales, p:perfundidos, t: tiempo, P: significación estadística.

GABA (CPM)

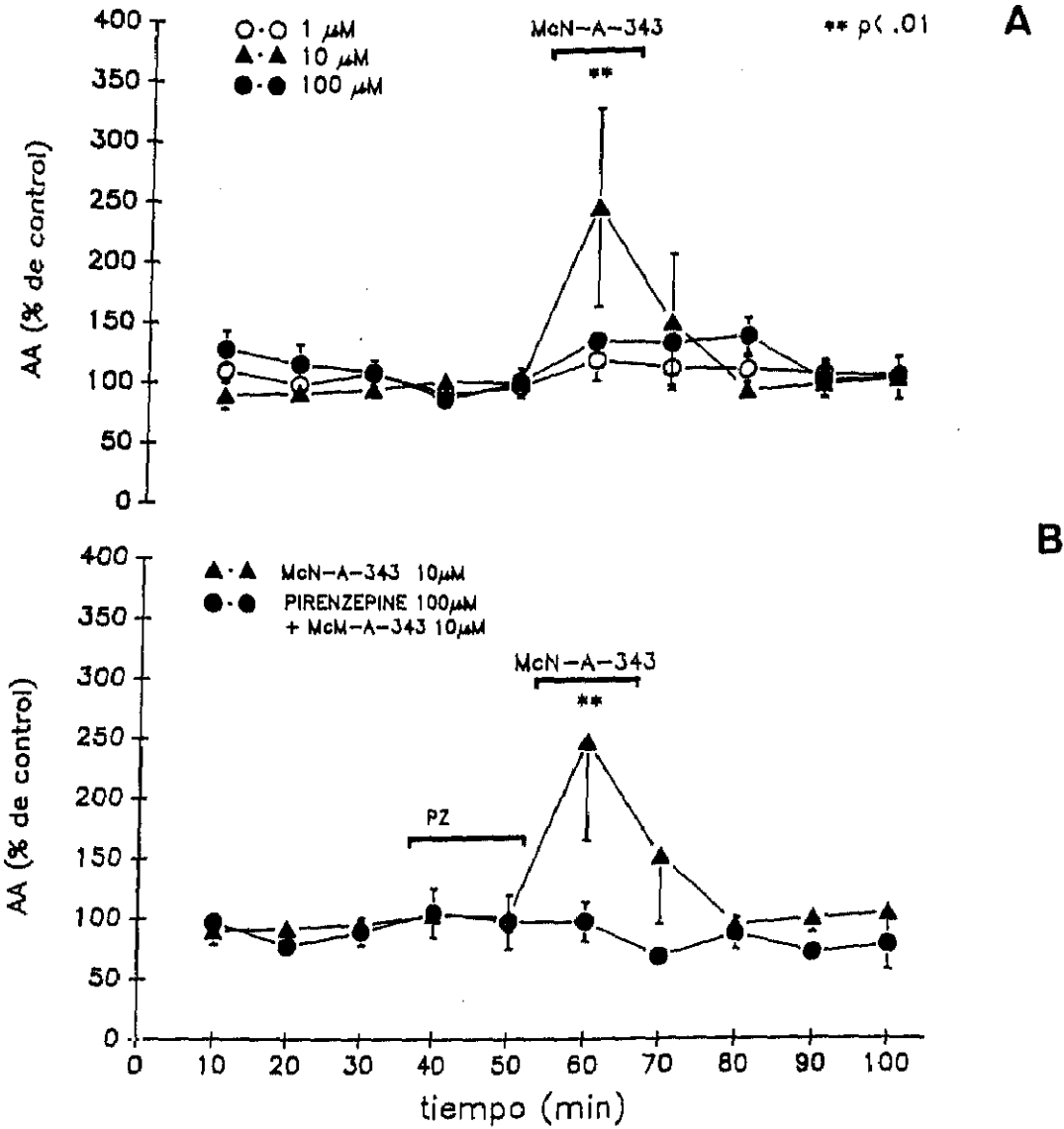


FIGURA 32: Representación en tantos por ciento respecto al control de los datos expresados en la tabla 19. a) Efecto de la perfusión intracortical de McN (1, 10 y 100 μM) sobre la [GABA] en la CPM de la rata. b) efecto de la perfusión intracortical de McN (10 μM) tras la perfusión PZ (100 μM) sobre la [GABA] en la CPM de la rata. Para hallar los porcentajes se tomó como control la media de los tres perfundidos anteriores al estímulo. En el eje de abcisas se indica el tiempo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

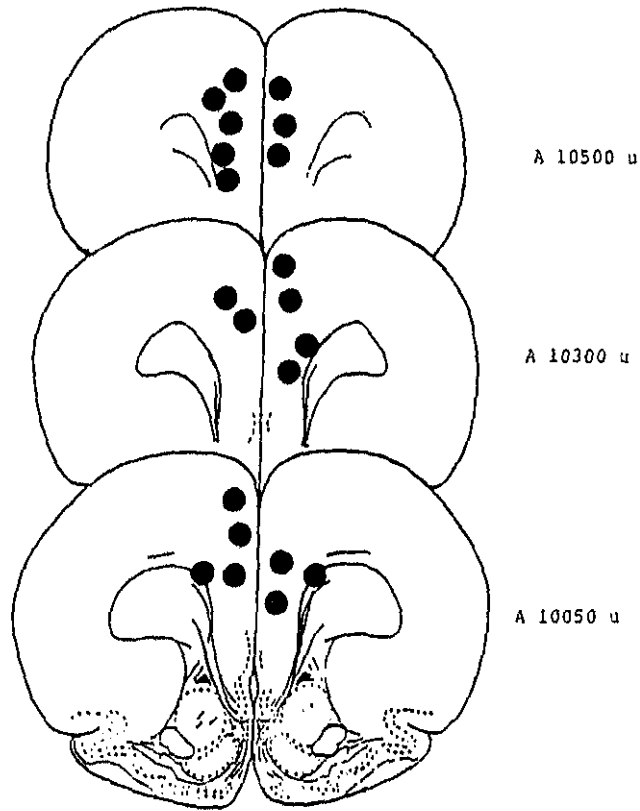


FIGURA 33: Localización histológica de la punta de las cánulas *push-pull* en los animales utilizados en el experimento 3.3.

DISCUSSION

1. ACERCA DE LOS METODOS.

1.1 Acerca del método de perfusión intracerebral *in vivo*

Las concentraciones extracelulares de neurotransmisores *in vivo* se pueden cuantificar mediante dos tipos de técnicas diferentes: técnicas *in situ* y *ex situ*. Las técnicas *in situ* detectan y miden compuestos químicos directamente en el espacio intersticial (voltametría) (Kissinger et al., 1973). Las técnicas *ex situ*, o de perfusión intracerebral, recogen sustancias del espacio intersticial para ser analizadas posteriormente. Existen varias técnicas *ex situ*: el *cup* cortical (McIntosh y Oborin (1953), la perfusión *push-pull* (Gaddum, 1961) y la diálisis (Bito et al., 1966).

La voltametría permite cuantificar las concentraciones extracelulares de neurotransmisores por medio de un microelectrodo, implantado en la región cerebral a estudiar, que oxida las moléculas de interés: esta oxidación genera unas corrientes que pueden ser relacionadas con las concentración de la molécula oxidada (Benveniste, 1989; Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993). La gran ventaja de esta técnica es que realiza la medición de las concentraciones de neurotransmisores *in situ*, poseyendo además un tiempo de resolución muy corto (Westerink y Justice, 1991). Sin embargo, la voltametría está limitada a la detección de neurotransmisores oxidables, teniendo además problemas de selectividad, ya que compuestos diferentes

pueden poseer potenciales de oxidación similares (Benveniste, 1989; Benveniste et al., 1989). A diferencia de la voltametría, las técnicas *ex situ* permiten detectar todas las sustancias químicas presentes en el espacio intersticial (Myers, 1986; Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Gardner, 1993).

El *cup cortical* consiste en un pequeño cilindro colocado quirúrgicamente en contacto directo con la superficie cortical. El *cup*, formado por el cilindro y la superficie cortical, puede ser perfundido con soluciones fisiológicas, permitiendo la recogida de sustancias difundidas desde la superficie cortical al líquido de perfusión (Benveniste, 1989; Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993). Esta técnica es la menos empleada de las técnicas *ex situ* dado que sólo permite la perfusión de estructuras cerebrales superficiales, usualmente la corteza (Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993). Las técnicas de perfusión *push-pull* y de diálisis, por el contrario, permiten acceder a todas las estructuras cerebrales (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993). Además, la técnica del *cup cortical* es difícil de aplicar a animales despiertos (Westerink y Justice, 1991).

Las técnicas de *push-pull* y diálisis son muy similares. Ambas utilizan una cánula de perfusión que es implantada en el área cerebral que se desea estudiar (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993). El diseño de la cánula es básicamente el mismo en ambas técnicas: dos cánulas, bien concéntricas o bien paralelas, a través de las cuales fluye el líquido de perfusión. La diferencia principal entre ambas técnicas consiste en la presencia, en el caso de la diálisis, de una

membrana dialítica en el extremo de la cánula de perfusión que evita el contacto directo del líquido de perfusión con el tejido cerebral e impide el paso de sustancias de elevado peso molecular (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993). Esta membrana evita, de este modo, el paso de proteínas y enzimas al líquido recogido.

1.1.1. Diálisis vs. *push-pull*

La principal ventaja de la presencia de la membrana dialítica es que impide la degradación de los neurotransmisores por las enzimas presentes en el líquido recogido, no siendo necesaria la desproteínización de las muestras antes de su análisis (Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993). No obstante, la membrana dialítica puede entorpecer el paso de algunas sustancias de interés presentes en el líquido extracelular, disminuyendo su concentración en el líquido de perfusión (Justice y Neil, 1986; Westerink y Justice, 1991). Esto obliga a utilizar un mayor tiempo de recogida para cada muestra y métodos de análisis más sensibles. Por otra parte, la recuperación de sustancias químicas desde el espacio extracelular a través de la membrana dialítica depende del coeficiente de difusión de dichas sustancias, del área de la membrana de diálisis, del flujo del líquido de perfusión, de las propiedades de la membrana y de la temperatura (Benveniste, 1989; Benveniste et al., 1989; Ungerstedt, 1991).

El sistema de perfusión *push-pull* evita los inconvenientes de la diálisis, debido a que existe un contacto directo del líquido de perfusión con el espacio intersticial (Myers, 1986). Sin embargo, provoca un mayor daño tisular debido al mayor tamaño de las cánulas de *push-pull*, 1 mm de

diámetro aproximadamente frente, a 0,6 mm en la diálisis, y a un flujo de perfusión más elevado, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ en el caso del *push-pull* con respecto los 1 a 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ usados en la diálisis (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993).

La técnica utilizada en los experimentos que se presentan en esta Tesis Doctoral fue la perfusión *push-pull*. Para minimizar el daño tisular que el uso de esta técnica provoca se tomaron las siguientes precauciones:

- Se emplearon sistemas de cánulas concéntricas que se obturan con menor frecuencia (Myers, 1986).
- La distancia existente entre los extremos distales de las cánulas *push* y *pull* fue de 0,3 mm. Con esta medida la eficacia en la recogida de sustancias desde el tejido cerebral está cercana al máximo para el flujo de perfusión empleado (Yaksh y Yamamura, 1974).
- El líquido de perfusión empleado fue isotónico con respecto al líquido cefalorraquídeo, ya que las soluciones isotónicas producen un menor daño tisular que las soluciones hipotónicas o hipertónicas (Yaksh y Yamamura, 1974).

Dado que tanto la diálisis como la perfusión *push-pull* producen un cierto daño tisular, se ha cuestionado el origen intracelular o extracelular de las sustancias presentes en el líquido recogido. Diversos autores han intentado contestar a esta cuestión a través de diferentes aproximaciones metodológicas:

- Se han cuantificado sustancias que están presentes, predominantemente en el espacio intracelular, como LDH, y cuya salida al espacio extracelular no está en relación con la actividad neuronal. Tras la aplicación de estímulos que inducen la liberación de neurotransmisores, las concentraciones extracelulares de estas sustancias no se modificaron (Greenfield et al., 1983).
- Se han infundido precursores de neurotransmisores marcados radiactivamente, obteniéndose posteriormente la liberación de neurotransmisores marcados, tanto en condiciones basales como tras estimulación (Besson et al., 1986; Mora y Myers, 1984).
- Se han infundido sustancias capaces de liberar neurotransmisores, como altas concentraciones de K^+ (30 a 100 mM). La obtención de un aumento en la liberación de neurotransmisores tanto en la técnica de perfusión *push-pull* como en la diálisis sugiere la integridad funcional de las neuronas en el punto de perfusión (Girault et al., 1986; Yamamoto y Davy, 1992; Campbell et al., 1993). En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio se perfundió K^+ 100 mM, dicho grupo se ha considerado el grupo control de los experimentos que aquí se presentan (Sanz, 1992).

Independientemente de la técnica de perfusión intracerebral utilizada, es conveniente comenzar a recoger muestras para su análisis después de obtener niveles estables del neurotransmisor estudiado (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991). En estudios previos de nuestro laboratorio se comprobó que los niveles de aminoácidos analizados

alcanzaron estabilidad tras 50 min de perfusión continua (Sanz, 1992; Porras, 1992). por lo que las muestras recogidas durante los 50 primeros min de perfusión no se analizaron en los experimentos.

Las técnicas de perfusión intracerebral tienen un último inconveniente. Transcurridos tres días desde la introducción de la cánula de perfusión se produce una reacción astrocitaria, con la consiguiente alteración de los niveles de neurotransmisores y de la difusión de éstos hacia el líquido de perfusión (Myers, 1986; Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991). En los experimentos que se presentan se evitó tal inconveniente llevando a cabo un único experimento en cada punto de perfusión.

1.1.2. *push-pull* discontinuo vs. *push-pull* continuo

El uso del *push-pull* lleva asociado la necesidad de un sistema de succión del líquido de perfusión que funcione simultáneamente a la infusión del mismo (Myers, 1986; Westerink y Justice, 1991; Gardner, 1993). Este problema se soluciona con el uso de las bombas de infusión-succión. A tales bombas se aplican dos jeringas de modo que una infunde líquido y la otra lo recoja. Tal proceder, sin embargo, tiene un importante inconveniente. Para recoger la muestra obtenida ha de interrumpirse la perfusión y extraerse la cánula *push-pull*. De este modo, a cada período de perfusión (ON) debe seguirle un período de interrupción de la perfusión (OFF) para llevar la muestra recogida desde la jeringa de succión a un vial. Cada período OFF exige la extracción de la cánula *push-pull* y cada período ON exige su nueva introducción. Tales manipulaciones podrían producir un mayor daño tisular,

así como la posibilidad de que los niveles de aminoácidos no sean fiel reflejo de su compartimento neurotransmisor.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado y utilizado la técnica de *push-pull* continuo, que evita los inconvenientes descritos al utilizar como fuerza de succión la gravedad y no necesitar, por tanto, una jeringa de succión (Mora y Porrás, 1993; Porrás y Mora, 1993; Sanz et al., 1993; Expósito et al., 1994; Segovia, 1995). Para ello, el extremo libre del tubo de recogida (el tubo adaptado a la cánula *pull*) se coloca en un colector de fracciones a una distancia del punto de perfusión tal, que la infusión y la extracción del líquido se realice al mismo flujo y simultáneamente. De este modo se evitan las sucesivas extracciones e introducciones de la cánula *push-pull* con lo cual se consigue:

- Un menor daño tisular.
- Una mejora en el seguimiento de los niveles del neurotransmisor en la estructura cerebral estudiada, pues no hay períodos OFF en los que se pierda información.

1.2. Acerca del método de análisis de aminoácidos

El procedimiento más empleado para el análisis de aminoácidos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) debido a su gran sensibilidad (en el rango de femtomoles) a su elevada capacidad de resolución y a su gran versatilidad (Lindroth y Mopper, 1979; Venema et al., 1983; Peinado et al., 1986; Ogden y Foldi, 1986). El método HPLC

permite utilizar pequeños volúmenes de muestra, métodos de derivación simples, permite un reducido tiempo de análisis y posee un coste menor que otros métodos cromatográficos (Venema et al., 1983; Peinado et al., 1986; Ogden y Foldi, 1986).

Dadas las ventajas de la cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de aminoácidos, éste fue el método utilizado en los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral.

1.2.1. Acerca de la derivación y cuantificación de aminoácidos

Para la cuantificación de los aminoácidos con el método HPLC es necesario hacer previamente una derivación de éstos. La derivación de los aminoácidos puede realizarse mediante diferentes técnicas: formación de PITC-derivados (con feniltioisocianato) (Bidingmeyer et al., 1984), formación de FMOC-derivados (con cloruro de 9-fluorometiloxycarbonilo) (Einarson et al., 1983) o formación de OPA-derivados (con o-ftaldehído) (Lindroth y Mopper, 1979).

La formación de PITC-derivados es un método poco sensible y que requiere un proceso largo (Ogden y Foldi, 1986).

La 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 y pueden existir interferencias entre ambos en el cromatograma (Ogden y Foldi, 1986).

Los OPA-derivados poseen una elevada fluorescencia y requieren un tiempo de reacción corto, por lo que este método es muy sensible para el análisis de aminoácidos, tanto con detector de fluorescencia (Korf y Venema, 1985; Smith y Panico, 1985), como con detector electroquímico (Allison y Shoup, 1984; Peinado et al., 1986). El detector electroquímico, sin embargo, es muy sensible a los cambios en la composición de la fase móvil y su empleo con programas de gradiente produce alteraciones de la línea base (Allison y Shoup, 1984). Dadas sus ventajas, el método de derivación de los aminoácidos usado en el presente estudio fue la formación de OPA-derivados, y su cuantificación se llevó a cabo con un detector de fluorescencia.

La reacción del o-ftaldehído (OPA) con los aminoácidos se realiza a un pH alcalino (9,5) y necesita un tiol como molécula auxiliar para dar lugar a un compuesto fluorescente (Lindroth y Mopper, 1979; Allison y Shoup, 1984). La intensidad de fluorescencia y la estabilidad de los OPA-derivados depende del tiol empleado (Venema et al., 1983; Allison y Shoup, 1984). Los compuestos derivados con mercaptoetanol o mercaptopropiónico exhiben una fluorescencia mas intensa que los derivados con tertbutiltiol, pero menor estabilidad (Allison y Shoup, 1984; Herranz et al., 1985; Ogden y Foldi, 1986). En este trabajo el compuesto utilizado para la formación de los OPA-derivados fue el ácido mercaptopropiónico, dada su mayor sensibilidad. Con el fin de minimizar la repercusión que la baja estabilidad de los derivados obtenidos pudiese tener sobre la cuantificación de los aminoácidos, se mantuvo constante en todos los experimentos, el tiempo transcurrido entre la adición del reactivo de derivación y la inyección de la muestra en el cromatógrafo.

1.2.2. Acerca de las condiciones cromatográficas.

Para conseguir una adecuada resolución de los picos cromatográficos, se utilizó una columna de fase inversa C₁₈ de 15 cm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula (Herranz et al., 1984, 1985). Se eligió una columna de longitud intermedia dado que las de mayor longitud si bien, permiten mejorar la separación de los picos cromatográficos, aumentan su anchura y hacen más lento el análisis, y las columnas de menor longitud requieren un menor tiempo de análisis pero poseen una menor resolución. Con el fin de aumentar la vida media de la columna analítica se utilizó una precolumna C₁₈ (Venema et al., 1983).

El pH de la fase móvil permite una adecuada separación de los OPA-derivados y se encuentra dentro de los márgenes tolerados por el relleno de la columna (2 < pH < 8). Dado que la derivación de las muestras requiere un pH de 9,5 (Allison y Shoup, 1984), previamente a su inyección se añadieron a las muestras 5 µM de ácido acético al 5% con el fin de evitar la pérdida de sílica de la columna (Cobo, 1990).

1.2.3. Acerca de la variabilidad del método de análisis.

El método de análisis de aminoácidos por HPLC acoplado a detectores tanto de fluorescencia como electroquímicos es un método sensible y reproducible para el estudio de los niveles endógenos de aminoácidos (Venema et al., 1983; Peinado et al., 1986). El método cumple las condiciones de linealidad entre 1 pmol y 10 nmoles de aminoácidos por muestra y para volúmenes de muestra comprendidos entre 10 y 500 µl (Venema

et al., 1983; Peinado et al., 1986). Las concentraciones a las cuales los aminoácidos están presentes en las muestras analizadas en este trabajo (0.01-1 μ M), así como los volúmenes de muestra utilizados (20 μ l), se encuentran dentro del rango en el que el método cumple la condición de linealidad. Además, con anterioridad a la realización de los experimentos se confirmó tal condición (ver apartado 3.3.2.4 de Materiales y Métodos, pag. 83).

2. ACERCA DE LOS RESULTADOS.

2.1 Acerca de neurotensina

2.1.1 Interacción NT-GLU en la corteza prefrontal medial de la rata

La perfusión intracortical de NT a la dosis de 1000 nM, produce un aumento de [GLU] en la CPM de la rata despierta; dicho efecto es bloqueado por la inyección i.p del antagonista D1-D2, HL(3 mg/kg) (fig. 20; pag. 91)

La NT presente en la CPM, se encuentra coexistiendo con DA en terminales que proyectan desde el AVT del mesencéfalo. En la CPM no existe NT intrínseca (Seroogy et al., 1987; Studler et al., 1988). En dicha región cortical los receptores neurotensinérgicos se encuentran mayoritariamente a nivel postsináptico y posiblemente se localicen sobre las neuronas piramidales (Hervé et al., 1986; Studler et al., 1988). Los resultados obtenidos en el trabajo que aquí se presenta, estan de acuerdo con los resultados de Audinat et al (1989) donde la NT tiene un efecto excitador

sobre las neuronas piramidales. Así, la aplicación iontoforética de NT produce la despolarización del 88% de las neuronas piramidales estudiadas (Audinat et al., 1989). Por tanto, el aumento de [GLU] obtenido en nuestros resultados, podría ser debido a un efecto directo de la NT sobre los receptores neurotensinérgicos, presuntamente localizados en las neuronas piramidales de la CPM.

Dado que en la CPM, NT y DA están coexistiendo en una misma terminal sináptica, el efecto que produce NT sobre [GLU] podría deberse, al menos en parte, a una modulación de los receptores dopaminérgicos por la unión de NT a su receptor, de forma que la NT facilitase la transmisión dopaminérgica y fuese la DA la que mediase la liberación de GLU (apartado 2.2.1) (gráfica 22, pag. 96). Fuxe et al (1992), en un estudio realizado en neuronas estriatales de rata, sugieren que la unión de NT a su receptor reduce la afinidad de los receptores D2 y aumenta la afinidad de los D1 (fig. 12, pag. 47); este efecto se produce mediante la existencia de una interacción intramembrana entre los receptores neurotensinérgicos y dopaminérgicos. Dicho modelo de interacción NT-DA, está de acuerdo con los trabajos realizados por Hétier et al (1988) en la CP, donde la NT aumenta la liberación evocada de DA (Hétier et al., 1988). Así mismo, nuestros resultados podrían ser explicados por este modelo; el hecho de que la inyección de HL atenúe los efectos producidos por la NT sobre el [GLU] podría ser debido a que la NT esté modulando los receptores de DA de forma que facilite la transmisión dopaminérgica, y sea ésta la que produzca la liberación de GLU.

2.2 Acerca de dopamina

2.2.1 Interacción DA-GLU en la corteza prefrontal medial de la rata

APO a la dosis de 10 μ M produce un aumento de la concentración extracelular de GLU en la CPM de la rata despierta. Este efecto es bloqueado por el antagonista dopaminérgico HL (3mg/kg) (fig. 22, pag. 96).

Las terminales dopaminérgicas, presentes en la CPM de la rata, proyectan desde el área ventrotegmental del mesencéfalo. Dichas terminales establecen contactos sinápticos con las neuronas piramidales corticales (Van Eden et al., 1987; Séguéla et al., 1988; Verney et al., 1990) que son de naturaleza glutamatérgica (Ottersen y Storm-Mathissen, 1984; Conti et al., 1987; Dorí et al., 1989) . En la CP existen receptores D1 y D2. Los receptores D2 se encuentran presentes en las terminales de las neuronas piramidales que proyectan a estriado, por tanto, podrían estar presentes en colaterales recurrentes de dichas neuronas (Retaux et al., 1991). Así mismo, se sugiere la existencia de receptores D1 en las dendritas de neuronas corticales piramidales (Retaux et al., 1991). Estos datos nos hacen suponer que el efecto de la APO sobre [GLU] (obtenidos en este trabajo) podría ser debido la acción directa de la APO sobre los receptores dopaminérgicos localizados en las neuronas piramidales glutamatérgicas.

Son muchos los estudios que indican que la APO tiene un papel inhibitor sobre las neuronas corticales piramidales (Mora et al., 1976; Bernardi et al., 1982; Bunney y Chiodo, 1984). El hecho de que APO en

nuestros resultados posea un efecto excitador sobre dichas neuronas piramidales y que este efecto sólo se alcance a la dosis intermedia podría ser debido al hecho de que APO no es un agonista dopaminérgico específico, así como al efecto de APO sobre la liberación de otros neurotransmisores tales como NT y GABA.

Dado que APO es un agonista mixto D1-D2, nuestros resultados podrían deberse a un balance entre los efectos excitadores e inhibidores de los dos tipos de receptores dopaminérgicos. De hecho, Thierry et al (1986) han propuesto que los receptores D1 son excitadores mientras que los receptores D2 poseen un efecto inhibitor en la CPM de rata (Thierry et al ., 1986). Morelli et al (1991) han sugerido recientemente que APO a dosis bajas actúa principalmente vía receptores D2, mientras que a dosis mayores actúa principalmente por medio de los receptores D1. Así, el balance existente entre la activación de receptores D1 y D2 por la APO podría explicar, en parte, nuestros resultados en los que APO sólo tiene efecto sobre las concentraciones extracelulares de GLU a la dosis intermedia.

Una interacción entre DA y otros neurotransmisores podría ser responsable, al menos en parte, del efecto de la APO sobre la liberación de GLU. Así, en la CPM existe una población de terminales dopaminérgicas donde DA se encuentra coexistiendo con el péptido NT, y los receptores para NT tienen una distribución paralela a los receptores D1 (Studler et al., 1988). La perfusión intracortical de APO produce una liberación de NT (Bean et al 1990), la cual como hemos visto anteriormente podría estar modulando los receptores dopaminérgicos, facilitando dicha transmisión (fig. 20, . pag. 91).

La DA tiene un efecto inhibitor sobre el disparo de las neuronas piramidales en la CPM (Mora et al., 1986; Bernardi et al., 1982; Bunney y Chiodo, 1984). Recientemente se ha sugerido que dicho efecto podría implicar un componente gabérgico y un componente dopaminérgico (Pirot et al., 1992). Así, estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que la estimulación de los receptores dopaminérgicos produce una liberación de GABA (Retaux et al., 1991; este trabajo, fig. 23, pag. 99) el cual tiene un efecto inhibitor sobre las neuronas piramidales (Krnjevic, 1974; Houser et al., 1984). Así pues, éste efecto inhibitor de la DA parece estar mediado por una excitación de las neuronas gabérgicas (Pirot et al., 1992). Esta interrelación entre DA, GABA y GLU podría explicar, al menos en parte que, en este estudio, APO sólo produzca efecto sobre [GLU] a la dosis intermedia.

2.1.2 Interacción DA-GABA en la corteza prefrontal medial de la rata

APO, a la dosis de 10 μ M, produce un aumento de [GABA] en la CPM de la rata despierta; dicho aumento no se produce cuando previamente se bloquean con HL (3 mg/kg) los receptores dopaminérgicos (fig. 23; pag. 99).

En la CPM, GABA se encuentra localizado, mayoritariamente, en neuronas no piramidales, concretamente en interneuronas (ver apartado 6.4.2, pag. 52). Hasta el momento no hay datos de que exista una relación directa entre las aferencias corticales dopaminérgicas y las neuronas gabérgicas, pero tanto la organización anatómica de las terminales gabérgicas y dopaminérgicas, como el hecho de que ambas terminales sinapsen sobre las neuronas piramidales, sugiere una posible interacción

entre estos neurotransmisores (Van Eden et al., 1987; Séguéla et al., 1988; Venney et al., 1990; Pirot et al., 1992). Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos anteriores en los que se muestra que DA incrementa la liberación de [³H]GABA procedente de tejido de la CPM (Retaux et al., 1991) y el disparo espontáneo de las interneuronas gabérgicas (Penit-Soria et al., 1987). Estos datos, junto con los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que el efecto de APO sobre la liberación de GABA en la CPM parece ser debido a una estimulación receptores dopaminérgicos localizados, probablemente, sobre las interneuronas gabérgicas.

2.3 Acerca de acetilcolina

2.3.1 Interacción GLU-ACh en la corteza prefrontal medial de la rata

La perfusión intracortical del agonista M1-M2, ARE (50, 100, 200 mM), produce un aumento de [GLU] en la CPM de la rata despierta (fig. 25 x; pag. 105). La perfusión intracortical del agonista M1, McN-A-343 (1, 10 y 100 µM), produce un aumento de [GLU], que es bloqueado por el antagonista M1, PZ (100 µM) (fig. 31; pag. 121). La inyección intraperitoneal del agonista M2, OXO (0,5; 1; 2 mg/kg), no produce ningún efecto sobre [GLU] en la CPM de la rata despierta (fig. 28; pag. 113).

La ACh presente en la CP proviene de neuronas intrínsecas y de aferencias que proyectan desde los núcleos basales de Meynert. Las terminales acetilcolinérgicas establecen contactos sinápticos con las dendritas de neuronas piramidales y con cuerpos de neuronas no piramidales (Houser et al., 1985). Tanto los receptores M1 los M2 están presentes en la

CP. Los receptores M1 se encuentran, posiblemente, sobre las neuronas piramidales (Chessell et al., 1993) y sobre las terminales dopaminérgicas (Ono et al., 1988; Marchi et al., 1990) mientras que los receptores M2, se encuentran en las terminales acetilcolinérgicas (Marchi y Raiteri., 1985).

El efecto excitador que posee la ARE y McN en el trabajo que aquí se presenta está de acuerdo con los resultados obtenidos por Bernardo (1993) donde la aplicación iontóforética de ACh produce un efecto excitador sobre las neuronas piramidales corticales (Bernardo, 1993), concretamente la activación de los receptores muscarínicos tiene un efecto excitador sobre las neuronas de la CPM (Andrade, 1991).

El hecho de que el efecto excitador que posee en nuestros resultados ARE, sea mimetizado por el agonista M1, McN, pero no por el M2, OXO, y que dicho efecto sea bloqueado por el antagonista M1, PZ, nos hace suponer que el efecto de la ARE es debido a la activación de receptores M1. Dado que los receptores M1 se encuentran sobre neuronas piramidales glutamatérgicas (Chessell et al., 1993), existe la posibilidad de que el efecto producido por la perfusión de ARE sobre la [GLU], así como de McN, se deba a un efecto directo sobre dichos receptores M1 situados en las neuronas piramidales.

Ahora bien, dado que los agonistas muscarínicos potencian la liberación evocada de DA (Marchi y Raiteri., 1985), y que sobre las terminales dopaminérgicas existen receptores muscarínicos, posiblemente M1 (Ono et al., 1988; Marchi et al., 1990), el efecto de la ARE, así como del McN, sobre [GLU] podría estar mediado, al menos en parte, por una

facilitación de la transmisión dopaminérgica, la cual produciría a su vez una liberación de GLU (fig. 22, pag. 96). Así pues, el efecto de la ACh sobre las neuronas piramidales glutamatérgicas podría deberse a un balance entre una excitación acetilcolinérgica y/o dopaminérgica y una inhibición gabérgica (ver apartado 2.3.2).

El hecho de que OXO no produzca ningún efecto sobre [GLU] está de acuerdo con estudios realizados por Meyer y Otero (1985), donde se sugiere que los receptores M2 actúan como autoreceptores y su activación produce una disminución de la liberación inducida de ACh.

2.3.2 Interacción ACh-GABA en la corteza prefrontal medial de la rata

La perfusión intracortical del agonista M1-M2, ARE (50, 100 y 200 mM), produce un aumento de [GABA] en la CPM de la rata despierta (fig. 26a, pag. 126). La perfusión intracortical del agonista M1, McN-A-343 (1, 10 y 100 μ M), produce un aumento de [GABA], que es bloqueado por el antagonista M1, PZ (100 μ M)(fig. 32b; pag. 124). La inyección intraperitoneal del agonista M2, OXO (0,5; 1; 2 mg/kg), no produce ningún efecto sobre [GABA] (fig. 29; pag. 116).

La ACh es un neurotransmisor que aunque, tal y como hemos visto en el apartado anterior, posee un papel principalmente excitador (Andrade, 1991; Bernardo, 1993), también hay estudios en los cuales se pone de manifiesto un papel inhibitor. Estudios iniciales realizados por Krnjevic et al., en 1966 sugieren que estos efectos inhibidores de la ACh podrían estar mediados por interneuronas gabérgicas (Krnjevic y Schwartz, 1966).

Posteriormente Sillito et al (1985) confirmaron esta hipótesis; de hecho las capas corticales donde la ACh produce más frecuentemente una inhibición aceticolinérgica son aquellas donde existe una mayor densidad de interneuronas gabérgicas (Sillito et al., 1985). Así mismo, estudios recientes muestran que la aplicación iontoforética de agonistas muscarínicos posee un efecto inhibitor sobre las neuronas piramidales de la CP (Vidal y Changeaux., 1993).

Nuestros resultados están de acuerdo con estos estudios, ya que tanto ARE como McN producen un aumento de [GABA], el cual posee un efecto inhibitor sobre las neuronas piramidales (Krnjevic, 1974; Houser et al., 1984).

El aumento de [GABA] podría ser debido a una estimulación directa de receptores M1, probablemente localizados sobre la interneuronas gabérgicas, ya que el efecto del agonista M1-M2 es mimetizado por el agonista M1, McN, y este efecto es bloqueado por el antagonista M1 (PZ). Ahora bien, tal y como hemos visto en el apartado anterior, los agonistas muscarínicos producen un aumento de la liberación evocada de DA, y DA, a su vez, produce un aumento de [GABA] (fig. 23, pag. 99). Por tanto, el efecto de ARE y McN sobre los niveles de GABA podrían estar mediados por una previa liberación de DA.

El hecho de que el agonista M2, OXO, no tenga ningún efecto sobre los niveles de GABA está de acuerdo con el hecho de que los receptores M2 en la corteza de la rata tienen papel de autoreceptores y modulan la liberación de ACh (Meyer y Otero, 1985).

CONCLUSIONES

PRIMERA

El agonista dopaminérgico D1-D2, apomorfina, produce un aumento significativo de [GLU], en la corteza prefrontal medial de la rata. Dicho aumento es atenuado por el bloqueo previo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol.

SEGUNDA

La neurotensina, produce un aumento significativo de la [GLU] en la corteza prefrontal medial de la rata. Dicho aumento es atenuado por el bloqueo previo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol. Estos datos sugieren que el aumento de la [GLU] producido por la neurotensina está mediado, al menos en parte, por la activación de receptores dopaminérgicos. Estos resultados indican la existencia de una interacción entre NT-DA-GLU en la corteza prefrontal medial de la rata.

TERCERA

El agonista dopaminérgico D1-D2, apomorfina, produce un aumento significativo de [GABA], en la corteza prefrontal medial de la rata. Dicho aumento es atenuado por el bloqueo previo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol. Estos datos sugieren la existencia de una interacción entre el GABA y la DA, en la corteza prefrontal medial de la rata.

CUARTA

El agonista acetilcolinérgico M1-M2, arecolina, produce un aumento significativo de la [GLU] en la corteza prefrontal medial de la rata . El agonista M1, McN-A-343, pero no el agonista M2, oxotremorina, produce igualmente un aumento de la [GLU]. El efecto del agonista M1 es atenuado por el bloqueo previo de los receptores acetilcolinérgicos con el antagonista pirenzepina. Estos datos sugieren la existencia de una interacción entre el GLU y la ACh, en la corteza prefrontal medial de la rata mediada por receptores M1.

QUINTA

El agonista acetilcolinérgico M1-M2, arecolina, produce un aumento significativo de la [GABA] en la corteza prefrontal medial de la rata . El agonista M1, McN-A-343, pero no el agonista M2, oxotremorina, produce igualmente un aumento de la [GABA]. El efecto del agonista M1 es atenuado por el bloqueo previo de los receptores acetilcolinérgicos con el antagonista pirenzepina. Estos datos sugieren la existencia de una interacción entre el GABA y la ACh, en la corteza prefrontal medial de la rata mediada por receptores M1.

BIBLIOGRAFIA

- ALLISON, L.A. y SHOUP, R.E. O-phthalaldehyde derivates of amines for high speed liquid chromatography electrochemistry. *Ann.Chem.* 56: 1089-1096 (1984)
- AMARA, S.G. y KUHAR, M.J. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Ann.Rev.Neurosci.* 16: 73-93 (1993)
- ANDERSON, K.J.; MONAGHAN, D.T.; BRIDGES, R.J.; TAVOULARIS, A.L. y COTMAN, C.W. Autoradiographic characterization of putative excitatory amino acid transport sites. *Neuroscience* 38: 311-322 (1990)
- ANDRADE, R. Cell excitation enhances muscarinic cholinergic responses in rat association cortex. *Brain Res.* 548: 81-93 (1991)
- AUDINAT, E.; HERMEL, J.M. y CREPEL, F. Neurotensin-induced excitation of neurons of the rat's frontal cortex studied intracellularly in vitro. *Exp.Brain Res.* 78: 358-368 (1989)
- AWAPARA, J.; LANDUA, A.J.; FUERST, R. y SEALE, B. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J.Biol.Chem.* 187: 35-39 (1950)
- BACHELARD, H.S. Biochemistry of centrally active amino acids. En: *Amino acid neurotransmitters*. Eds: F.V. DeFeudis y P. Mandel. Raven Press, New York: 475-497 (1981)

Bibliografia

BEAL, M.F.; KOWALL, N.W.; ELLISON, D.W.; MAZUREK, M.F.; SWARTZ, K.J. y MARTIN, J.B. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321: 168-172 (1986)

BEAN, A.J.; DURING, M.J. y ROTH, R.H. Effects of dopamine autoreceptor stimulation on the release of colocalized transmitters: in vivo release of dopamine and neurotensin from rat prefrontal cortex. *Neurosci.Lett.* 108: 143-148 (1990)

BEAN, A.J. y ROTH, R.H. Dopamine-Neurotensin interaction in mesocortical neurons. Evidence from microdialysis studies. En: *The neurobiology of neurotensin*. Eds: P. y CB. Nemeroff. Annals of the New York Academy of Sciences., New York: 43-53 (1992)

BECKSTEAD, R.M. An autoradiographic examination of the cortico-cortical and subcortical projection of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J.Comp.Neurol.* 184: 43-62 (1979)

BENVENISTE, H. Brain microdialysis. *J.Neurochem.* 52: 1667-1679 (1989)

BENVENISTE, H.; HANSEN, A.J. y OTTOSEN, N.S. Determination of brain interstitial concentration by microdialysis. *J.Neurochem.* 52: 1741-1750 (1989)

BERNARDI, G.; CHERUBINI, E.; MARCIANI, MG.; MERCURI, N. y STANZIONE, P. Responses of intracellularly recorded cortical neurons to the iontophoretic application of dopamine. *Brain Res.* 245: 267-274 (1982)

- BERNARDO, L.S. Characterization of cholinergic and noradrenergic slow excitatory postsynaptic potentials from rat cerebral cortical neurons. *Neuroscience* 53: 11-22 (1993)
- BESSON, M.J.; KIMBL, M.L.; GAUCHY, C.; GIRAULT, J.A.; SPAMPINATO, V.; LANTIN, N.; DESBAN, M. y GLOWINSKI, J. In vivo measurement of [³H]GABA release: an approach to study of the regulation of GABA-containing neurons in the basal ganglia and associated structures in the cat and the rat. En: *Neurochemical analysis of the conscious brain: voltammetry and push-pull perfusion*. Eds: R.D. Myers y P. Knott. Ann.N.Y.Acad.Sci. Vol. 473, 475-488 (1986)
- BIRTLE, A. y ROSENGREN, K. Occurrence and distribution of catechol amines in brain. *Acta Physiol.Scand.* 47: 350-361 (1959)
- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A. y TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J.Chromatogr.* 336: 93-104 (1984)
- BITO, L.; DAVSON, H.; LEVIN, E.; MURRAY, M. y SNIDER, N. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J.Neurochem.* 13: 1057-1067 (1966)
- BITTIGER, H.; FROSTL, W.; MICKEL, S.J. y OLPE, H-R. GABA-B receptor antagonists: from synthesis to therapeutic applications. *TINS* 14: 391-394 (1993)

- BJORKLUND, A. y LINDVALL, O.** Dopamine containing systems in the CNS. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol 2: Classical transmitters in the CNS, Part I.* Eds: A. Bjorklund y T. Hokfelt. Elsevier, Amsterdam: 55-122 (1984)
- BONANNO, G.; FONTANA, G. y RAITERI, M.** Phaclofen antagonizes GABA-A autoreceptors regulating release in rat cortex. *Eur.J.Pharmacol.* 154: 223-224 (1988)
- BONANNO, G. y RAITERI, M.** Multiple GABA-B receptors. *TIPS* 14: 259-261 (1993)
- BONNER, T.I.** The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *TINS* 14: 148-151 (1989)
- BOWERY, N.G.** GABA-B receptor pharmacology. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 33: 109-147 (1993)
- BOWERY, N.G.; HUDSON, A.L. y PRICE, G.W.** GABA-A and GABA-B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20: 365-383 (1987)
- BOYSON, S.J.; McONIGLE, P. y MOLINOFF, P.B.** Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J. Neurosci.* 6: 3177-3188 (1986)

BOZOU, J.C.; ROCHET, N.; MAGNALDO, I.; VINCENT, J.P. y , P. Neurotensin stimulates inositol trisphosphate-mediated calcium mobilization but not protein kinase C activation in HT29 cells. *Biochem.J.* 264: 871-878 (1989)

BRADFORD, H.F. *Fundamentos de neuroquímica*. Labor, Barcelona (1988)

BRADFORD, H.F. y WARD, H.K. On glutaminase in mammalian synaptosomes. *Brain Res.* 110: 115-125 (1976)

BRADFORD, H.F.; WARD, H.K. y THOMAS, A.J. Glutamine-A major substrate for nerve endings. *J.Neurochem.* 30: 1453-1459 (1978)

BROADMAN, K. *Vergleichende lokalisationen lehre der grosshirnrinde in ihren prinzipien dargestellt auf grund des zellenbaues*. Leipzig. (1909)

BUNNEY, B.S. y CHIDO, L.A. Mesocortical dopamine systems: further electrophysiological and pharmacological characteristics. En: *Monoamine Innervation of Cerebral Cortex*. Eds: L. Descarries; TR. Reader y HH. Jasper. Alan R. Liss, New York: 263-277 (1984)

CAMPBELL, K.; KALÉN, P.; LUNDBERG, C.; WICTORIN, K.; ROSENGREN, E. y BJÖRKLUND, A. Extracellular gamma-aminobutyric acid levels in the rat caudate-putamen: monitoring the neuronal and glial contribution by intracerebral microdialysis. *Brain Res.* 614: 241-250 (1993)

CARRAWAY, R. y LEEMAN, S.E. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J.Biol.Chem.* 248: 6854-6861 (1973)

CAVADA, C. y REINOSO-SUAREZ, F. Interhemispheric cortico-cortical connections of the prefrontal cortex in the cat. *Neurosci.Lett.* 24: 211-214 (1981a)

CAVADA, C. y REINOSO-SUAREZ, F. Intrahemispheric cortico-cortical afferent connections of the prefrontal cortex in the cat. *Brain Res.* 223: 128-133 (1981b)

CHESSELL, I.P.; FRANCIS, P.T.; PANGALOS, M.N.; PEARSON, R.C.A. y BOWEN, D.M. Localization of muscarinic (m1) and other neurotransmitter receptors on corticofugal-projecting pyramidal neurones. *Brain Res.* 632: 86-94 (1993)

COBO, M. *Aminoácidos acídicos y autoestimulación en la corteza prefrontal de la rata: estudio neurofarmacológico y neuroquímico.* Tesis Doctoral, Madrid, Universidad Complutense, (1990)

CONTI, F.; RUSTIONI, A.; PETRUSZ, P. y TOWLE, A.C. Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *J.Neurosci.* 7: 1887-1901 (1987)

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E. y ROTH, R.H. *The biochemical basis of neuropharmacology.* Oxford University Press, New York (1982)

- COTMAN, C.W.; MONAGHAM, D.T.; OTTERSEN, O.P. y STORM-MATHISEN, J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *TINS* 10: 273-280 (1987)
- CUBLO, A.C. y SOFRONIEW, P.R. The anatomy of the CNS cholinergic neurons. *TINS* 7: 74-78 (1984)
- CUMMINS, C.J.; GLOVER, R.A. y SELLINGER, O.Z. β -alanine is not a marker for brain astroglia in culture. *Brain Res.* 239: 299-302 (1982)
- CURTIS, D.R.; PHILLIS, J.W. y WATKINS, J.C. Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183: 611 (1959)
- DALB, H.H. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 6: 147-190 (1914)
- DAVIS, T.P.; GILLESPIE, T.J. y KONINGS, P.N.M. Specificity of neurotensin metabolism by regional rat brain slices. *J.Neurochem.* 2(85): 608-617 (1992)
- DIVAC, I.; KOSMAL, A.; BJORKLUND, A. y LINDVALL, O. Subcortical projections to the prefrontal cortex in the rat is revealed by the horseadish peroxidase technique. *Neuroscience* 3: 785-796 (1978)
- DOBNER, P.R.; BARBER, D.L.; VILLA-KOMAROFF, L y McKIERNAN, C. Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3516-3520 (1987)

- DORI, I.; PETROV, M. y PARNAVELAS, J.G. Excitatory transmitter amino acid-containing neurons in the rat visual cortex: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J.Comp.Neurol.* 290: 169-184 (1989)
- BINARSSON, S.; JOSEFSSON, B. y LAGERKVIST, S. Determination of amino acids with 9-fluoroenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 282: 609-618 (1983)
- EMSON, P.C. y KOOB, G.F. The origin and distribution of dopamine containing afferents to the frontal cortex. *Brain Res.* 142: 249-267 (1978)
- ESPLAPEZ, M.; CAMPISTRON, G. y TROTTIER, S. Immunocytochemical localization and morphology of GABA-containing neurons in the prefrontal and frontoparietal cortex of the rat. *Neurosci.Lett.* 77: 131-136 (1987)
- EXPOSITO, I.; SANZ, B.; PORRAS, A. y MORA, F. Effects of apomorphine and L-methionine sulphoximine on the release of excitatory amino acid neurotransmitters and glutamine in the striatum of the conscious rat. *Eur.J.Neurosci.* 6: 287-291 (1994)
- PAGG, G.E. y FOSTER, A.C. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9: 701-719 (1983)
- FAROOQUI, A.A. y HORROCKS, L.A. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res.Rev.* 16: 171-191 (1991)

Bibliografía

- FLOREZ, J.; ARMIJO, J.A. y MEDIAVILLA, A. *Farmacología Humana*. EUNSA, Pamplona (1988)
- FONNUM, P. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J.Neurochem.* 42: 1-11 (1984)
- FONNUM, P. Neurochemical studies on glutamate-mediated neurotransmission. En: *Excitatory amino acids*. Eds: B.S. Meldrum; F. Moroni; R.P. Simon y J.H. Woods. Raven Press, New York: 15-28 (1991)
- FONNUM, P.; SORBIDE, A.; KVALA, I.; WALKER, J. y WALAAS, I. Glutamate in cortical fibers. *Adv.Biochem.Physicopharmacol.* 27: 29-42 (1981a)
- FONNUM, P.; STORM-MATHISEN, J. y DIVAC, I. Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibers in rat brain. *Neuroscience* 6: 863-873 (1981b)
- FOXE, K.; VON EULER, G.; AGNATI, L.P.; MERLO, E.; O'CONNOR, W.T.; TANGANELLI, S.; LI, M.X.; TINNER, B.; CINTRA, A.; CARANI, C. y BENFENATI, F. *Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like actions of neurotensin*. Ann. N.Y. Acad. Sci. New York (1992)
- FYKSE, E.M. y FONNUM, P. Uptake of Γ -aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *J.Neurochem.* 50: 1237-1242 (1988)
- GADDUM, J.H. Push-pull cannulae. *J.Physiol.* 120: 1P-2P (1961)

GARDNER, E.L.; CHEN, J. y PAREDES, W. Overview of chemical sampling techniques. *J.Neurosci.Methods* 48: 173-197 (1993)

GIRAULT, G.A.; BARBEITO, L.; SPAMINATO, U.; GOZLAN, H.; GLOWINSKI, J. y BESSON, M-J. 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 (1986)

GREENAMYRE, J.T. y YOUNG, A.D. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging* 10: 593-602 (1989)

GREENFIELD, A.S.; CHERAMY, A. y GLOWINSKI, J. Evoked release of proteins from central nervous system in vivo. *J.Neurochem.* 40: 1048-1057 (1983)

GUDERSEN, V.; DANBOLT, N.C.; OTTERSEN, O.P. y STORM-MATHISEN, J. Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience* 57: 97-111 (1993)

HAMBERGER, A.C.; CHIANG, G.H.; NYLEN, E.S.; SCHEFF, J.W. y COTMAN, C.W. Glutamate as CNS transmitter. Evaluation of glucose and glutamine as precursor for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res.* 168: 513-530 (1979)

HAMMER, R.; BERRIE, C.P.; BIRDSALL, N.J.M.; BURGON, A.S.V. y HLUME, E.C. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 283: 984-987 (1980)

Bibliografía

- HASSLER, R.A.; HAUG, P.; NITSCH, C.; KIM, J.S. y PAIK, K. Effect of motor and premotor cortex ablation on concentrations of amino acids, monoamines and acetylcholine and on the ultrastructure rat striatum. A confirmation of glutamate as the specific cortico-striatal transmitter. *J.Neurochem.* 38: 1087-1098 (1982)
- HERRANZ, A.S.; CRISTIN, J.L.R.; LERMA, J. y MARTIN DEL RIO, R. 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* 58-59 (1985)
- HERRANZ, A.S.; LERMA, J. y MARTIN DEL RIO, R. Determination of gamma-aminobutyric acid in physiological samples by simple, rapid high-performance liquid chromatography method. *J.Chromatogr.* 309: 139-144 (1984)
- HERVE, D.; TASSIN, J.P.; STUDLEN, J.M.; PANA, D.; , P.; VINCENT, J.P.; GLOWINSKI, J. y ROSTENE, W. Dopaminergic control of I-labeled neurotensin binding site density in corticolimbic structure of the rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83: 6203-6207 (1986)
- HETIER, E.; BOIREAU, A.; DUBEDAT, P. y BLANCHARD, J.C. Neurotensin effects on evoked release of dopamine in slices from striatum, nucleus accumbens and prefrontal cortex in rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmac.* 337: 13-17 (1988)

- HOLLMANN, M. y HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. *Annu.Rev.Neurosci.* 17: 31-108 (1994)
- HOUSER, CR.; BARBER, RP.; CRAWFORD, GD.; MATTHEWS, PE.; PHELPS, PE.; SALVATERRA, PM. y VAUGHN, JE. Species-specific second antibodies reduce spurious staining in immunocytochemistry. *J.Histochem.Cytochem.* 32: 395-402 (1984)
- HOUSER, C.R.; CRAWFORD, G.D.; BARBER, R.P.; SALVATERRA, P.M. y VAUGHN, J.E. Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferasa. *Brain Res.* 266: 97-119 (1983)
- HOUSER, C.R.; CRAWFORD, G.D.; SALVATERRA, P.M. y VAUGHN, J.E. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferasa in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J.Comp.Neurol.* 234: 17-34 (1985)
- IVERSEN, L.L.; IVERSEN, S.D.; BLOOM, F.E.; DOUGLAS, C.; BROWN, M. y VALE, W. Calcium dependent release of somatostatine and neurotensin from rat brain in vitro. *Nature* 273: 161-163 (1978)
- IVERSEN, L.L. y KELLY, J.S. Uptake and metabolism of γ -aminobutyric acid by neurons and glial cells. *Biochem.Pharmacol.* 24: 933-938 (1975)

JONES, B.N.; PAABO, S. y STEIN, S. Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthaldehyde precolumn labelling procedure. *J. Liquid chromatogr.* 4: 575-586 (1981)

JONES, C.A.; ZIEMPLENI, E.; DAVIS, B. y REYNOLDS, G.P. Glutamate stimulates dopamine release from cortical and limbic rat brain in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 242: 183-187 (1993)

JUSTICE, J.B. y NRILL, D.B. Interpretation of voltammetry in vivo using dialyzed perfusions. En: *Neurochemical analysis of the conscious brain: voltammetry and push-pull perfusion*. Eds: R.D. Myers y P. Knott. Ann.N.Y.Acad.Sci. Vol. 473, 170-187 (1986)

KALSBERG, A. *Dopamine and the development of rat prefrontal cortex*. Amsterdam (1989)

KALIVAS, P.W. y MILLER, J.S. Neurotensin neurons in the ventral tegmental area project to the medial nucleus accumbens. *Brain Res.* 300: 157-160 (1984)

KANDEL, E.R. y SCHWARTZ, J.H. *Principles of neural sciences*. Elsevier, Amsterdam (1985)

KISSINGER, P.T.; HART, J.B. y ADAMS, R.N. Voltammetry in brain tissue - a new neurophysiological measurement. *Brain Res.* 55: 209-213 (1973)

KITAGBI, P.; NADAI, F.; ROVERE, C. y BIDARD, J.M. Biosynthesis, Maturation, Release and Degradation of neurotensin and neuromedin N. En: *The Neurobiology of Neurotensin*. Eds: P. y Ch.B. Nemeroff. Ann. New York Acad. Scien., New York: 30-42 (1992)

KITAGBI, P.; DE NADAI, F.; CUBER, J.C.; DUBUC, I.; NOUEL, D. y COSTETIN, J. Calcium-dependent release of neuromedin N and neurotensin from mouse hypothalamus. *Neuropeptides* 15(2): 111-114 (1990)

KOBAYASHI, R.M.; BROWN, M. y VALE, W. Regional distribution of neurotensin and somatostatin in the rat brain. *Brain Res.* 126: 584-588 (1977)

KONIG, J.F.R. y KLIPPEL, R.A. *The rat brain*. R.E. Krieger Publishing Co., New York (1967)

KORF, J. y VIKKMA, K. Amino acids in rat striatal dialysates: methodological aspects and changes after electroconvulsive shock. *J.Neurochem.* 45: 1341-1348 (1985)

KRETTKEK, J.R. y PRICE, J.L. Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat. *J.Comp.Neurol.* 172: 687-722 (1977a)

KRETTKEK, J.R. y PRICE, J.L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J.Comp.Neurol.* 171: 157-191 (1977b)

- KRNJEVIC, K. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol.Rev.* 54: 418-540 (1974)
- KRNJEVIC, K. y PHILLIS, J.W. Sensivity of cortical neurones to acetylcholine. *Experientia* 17: 469 (1961)
- KRNJEVIC, K. y PHILLIS, JW. Acetylcholine-sensitive cells in the cerebral cortex. *J.Physiol.Lond.* 166: 296-327 (1963)
- KRNJEVIC, K. y SCHWARTZ, S. Is gamma-aminobutyric acid an inhibitory transmitter? *Nature* 211: 1372-1374 (1966)
- LAPCHAK, P.A.; ARAUJO, D.M.; QUIRION, R. y BEAUDET, A. Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release from rat cerebral cortex: effect of quinolinic acid lesions of the basal forebrain. *J.Neurochem.* 55: 1397-1403 (1990)
- LARSSON, O.M.; GRIFFITHS, R.; ALLEN, I.C. y SCHOUSBOE, A. Mutual inhibition kinetic analysis of gamma-aminobutyric acid, taurine, and β -alanine high-affinity transport into neurons and astrocytes: evidences for similarity between taurine and β -alanine carriers in both cell types. *J.Neurochem.* 47: 426-432 (1986)
- LEONARD, C.M. The prefrontal cortex of the rat I. Cortical projections of the mediodorsal nucleus II. Efferent connections. *Brain Res.* 12: 321-343 (1969)

- LEONARD, C.M. The connections of the dorsomedial nuclei. *Brain Behav. Evol.* 6: 524-541 (1972)
- LERMA, J.; HERRANZ, A.S.; HERRERAS, O.; ABRAIRA, V. y MARTIN DEL RIO, R. 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 (1986)
- LESTER, H.A.; MAGIER, S.; QUICK, M.W. y COREY, J.L. Permeation properties of neurotransmitter transporters. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 34: 219-249 (1994)
- LINDROTH, P. y MOPPER, K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amount amino acids by precolumn fluorescence derivatation with OPA. *Ann.Chem.* 51: 1667-1674 (1979)
- LINDWALL, O. y BJORKLUND, A. The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glioxilic acid fluorescence method. *Acta Physiol.Scand.* 412: 4-48 (1974)
- LOEWI, O. Ubertragbarkeit der Herznervenwirkung. I. Mitteilung. *Pflugers Arch.* 189: 239-242 (1921)
- MCDONALD, R.L. y OLSEN, R.W. GABA-A receptor channels. *Annu.Rev.Neurosci.* 17: 569-602 (1994)

Bibliografía

- MARAGOS, N.P.; GREENAMYRE, J.T.; PENNY, J.B. y YOUNG, A.B. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *TINS* 10: 68 (1987)
- MARCHI, M. y RAITERI, M. On the presence in the cerebral cortex of muscarinic receptor subtypes which differ in neuronal localization, function and pharmacological properties. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 235: 230-233 (1985)
- MARCHI, M.; RUBLLI, A.; ANDRIOLI, G.C. y RAITERI, M. Pirenzepine-insensitive muscarinic autoreceptors regulate acetylcholine release in human neocortex. *Brain Res.* 520: 347-350 (1990)
- MARTIN, D.L. Short-term control of GABA synthesis in brain. *Prog.Biophys.molec.Biol.* 60: 17-28 (1993)
- MARTIN DE ANDRÉS, A. y LUNA DEL CASTILLO, J.D. *Biostatística para las ciencias de la salud*. Ediciones Norma, Madrid (1990)
- MARTIN, D.L. y RIMWALL, K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J.Neurochem.* 60: 395-407 (1993)
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BRILL, K.P. y NOREMBERG, M.D. Glutamine synthetase glial localization in brain. *Science* 195: 1356-1358 (1977)

- McGEEER, P.L. y McGEER, E.G. Amino acid neurotransmitters. En: *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Eds: G.J. Siegel; B.W. Agranoff; R.W. Albers y P.B. Molinoff. Raven Press, New York: 311-332 (1989)
- McGEEER, P.L.; McGEER, E.G.; SCHERER, V. y SINGH, K. A glutamatergic corticostriatal pathway. *Brain Res.* 128: 369-373 (1977)
- McINTOSH, P.C. y OBORIN, P.R. Release of acetylcholine from intact cerebral cortex. *Abstracts of Communications, XIX International Physiological Congress* 580-581 (1953)
- MELUSAM, M.M.; MUPSON, E.J.; WAINER, B.H. y LEVEY, A.I. Central cholinergic pathways in the rat: An overview based on an alternative nomenclature. *Neuroscience* 10: 1185-1201 (1983)
- MEYER, R.M. y OTERO, D.H. Pharmacological and ionic characterizations of the muscarinic receptors modulating [³H]acetylcholine release from rat cortical synaptosomes. *J. Neurosci.* 5: 1202-1207 (1985)
- MORA, F. y MYERS, R.D. 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 (1984)

- MORA, F.; PEINADO, J.M. y MYERS, R.D. Amino acids profiles in cortex of conscious rat: present studies and future perspectives. En: *Neurochemical analysis of the conscious brain: voltametry and push-pull perfusion*. Eds: RD. Myers y P. Knott. Ann.N.Y.Acad.Sci., New York: 461-474 (1986)
- MORA, F. y PORRAS, A. Effects of amphetamine on the release of excitatory amino acid neurotransmitters in the basal ganglia of the conscious rat. *Can J.Physiol.Pharmacol.* 71: 348-351 (1993)
- MORA, F. y SANGUINETTI, A.M. *Diccionario de Neurociencias*. Alianza Editorial, Madrid (1994)
- MORA, F.; SWEENEY, K.F.; ROOLS, E.T. y SANGUINETTI, A.M. Spontaneous firing rate of neurones in prefrontal cortex of the rat: evidence for a dopaminergic inhibition. *Brain Res.* 116: 516-522 (1976)
- MORELLI, M.; FENU, S.; COZZOLINO, A. y DI CHIARA, G. Positive and negative interactions in the behavioural expression of D1 and D2 receptor stimulation in a model of parkinsonism: role of priming. *Neuroscience* 42: 41-48 (1991)
- MUGNAINI, E. y OERTEL, W.H. An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. En: *Handbook of chemical neuroanatomy. Vol. 4: GABA and neuropeptides in the CNS, Part I*. Eds: A. Björklund y T. Hökfelt. Elsevier, Amsterdam: 436-608 (1985)

MYERS, R.D. Methods for perfusing different structures of the brain. En: *Methods in Psychobiology*. Ed: R.D. Myers. Academic Press, Londres: 169-211 (1972)

MYERS, R.D. 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: R.D. Myers y P. Knott. Ann.N.Y.Acad.Sci. Vol. 473, 21-41 (1986)

NAITO, S. y UEDA, T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J.Neurochem.* 44: 99-109 (1985)

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597-603 (1992)

NEMEROFF, C.B.; LUTTINGER, D.; HERNANDEZ, D.E.; MAILMAN, R.B.; MASON, G.A.; DAVIS, S.D.; WIDERLOV, E.; FRYE, G.D.; KILTS, C.A.; BEAUMONT, K.; BREESE, G.R. y PRANGE, A.J.J.R. Interactions of neurotensin with dopamine systems: biochemical and behavioral studies. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 225: 337-345 (1983)

NICHOLLS, D.G. Release of glutamate, aspartate, and Γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J.Neurochem.* 52: 331-341 (1989)

NICHOLLS, D.G The glutamatergic nerve terminal. *Eur.J.Biochem.* 212: 613-631 (1993)

NICHOLLS, D.G y ATTWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids. *TINS* 11: 462-468 (1990)

OBATA, K. y TAKEDA, K. Release of GABA into the fourth ventricle induced by stimulation of the cat cerebellum. *J.Neurochem.* 16: 1043-1047 (1969)

OGDEN, G. y FOLDI, P. Amino acid analysis: an overview of current methods. *Liquid Chromatography - Gas Chromatography* 5: 28-40 (1986)

ONO, S.; SAITO, Y.; OHGANE, N.; KAWANISHI, G. y MIZOBE, F. Heterogeneity of muscarinic autoreceptors and heteroreceptors in the rat brain: effects of a novel M1 agonist, AP102B. *Eur.J.Pharmacol.* 155: 77-84 (1988)

O'TIERSEN, O.P. y STORM-MATHISEN, J. Glutamate and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J.Comp.Neurol.* 229: 374-429 (1984)

PEINADO, J.M.; McANUS, K-T. y MYERS, R.D. Rapid method for micro-analysis of endogenous amino acid neurotransmitters in brain perfusates in the rat by isocratic HPLC-EC. *J.Neurosci.Methods* 18: 269-276 (1986)

PEINADO, J.M. y MORA, F. Glutamic acid as a putative transmitter of the interhemispheric corticocortical connections in the rat. *J.Neurochem.* 47: 1598-1603 (1986)

- PENIT-SORIA, J.; AUDINAT, E. y CREPEL, F. Excitation of rat prefrontal cortical neurons by dopamine: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res.* 425: 263-274 (1987)
- PHILLIS, J.W. y YORK, D.H. Cholinergic inhibition in the cerebral cortex. *Brain Res.* 5: 517-520 (1967)
- PIROT, S.; GODBOUT, R.; MANTZ, J.; TASSIN, J.P.; GLOWINSKI, J. y THIERRY, A.M. Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and gabaergic components. *Neuroscience* 4: 857-865 (1992)
- PLAITAKIS, A.; REERL, S. y YAHIR, M.D. Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 216: 193-196 (1982)
- PORRAS, A. *Correlación entre los niveles extracelulares de ácido aspártico y serina en corteza prefrontal y ganglios basales de la rata determinados por la técnica de perfundido intracerebral in vivo.* Tesis de Licenciatura, Madrid, Universidad Complutense (1992)
- PORRAS, A. y MORA, P. Dopamine receptor antagonist blocks the release of glycine, GABA, and taurine produced by amphetamine. *Brain Res.Bull.* 31: 305-310 (1993)
- RAYMOND, L.A.; BLACKSTONE, C.D. y HUGANIR, R.L. Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptor in synaptic plasticity. *TINS* 16: 147-153 (1993)

- RETAUX, S.; BESSON, M.J. y PENIT-SORIA, J. Opposing effects of dopamine D2 receptor stimulation on the spontaneous and the electrically evoked release of ^3H -GABA on rat prefrontal cortex slices. *Neuroscience* 42: 61-71 (1991)
- ROBERTS, E. y FRANKEL, S. Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J.Biol.Chem.* 187: 55-63 (1950)
- ROBINSON, M.B. y COYLE, J.T. Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *FASEB J.* 1: 446-455 (1987)
- ROSABAL, P. Cytoarchitecture of the lobe of the squirrel monkey. *J.Comp.Neurol.* 130: 87-108 (1967)
- ROSE, J.E. y WOOLSKY, C.N. The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep, and cat. *Res.Publs.Ass.Res.Ner.Ment.Dis.* 27: 210-232 (1948)
- SADOUL, J.L.; MAZELLA, J.; AMAR, S.; KITAGBI, P. y VINCENT, J.P. Preparation of neurotensin selectively iodinated on the tyrosine 3 residue. Biological activity and binding properties on mammalian neurotensin receptors. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 120: 812-819 (1984)
- SAKAMOTO, M.; MITCHEL, J.P.; KIYAMA, H.; THYAMA, M.; KROPP, M. y PEARSON, J. Neurotensin immunoreactivity in the human cingulate gyrus, hippocampal, subiculum and mammillary bodies. Its potential role in memory processing. *Brain Res.* 375: 351-356 (1986)

SAKANAKA, M.; SHIOSAKA, S.; TAKATSUKI, K. y TOHYAMA, M. 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 (1983)

SANZ, B. *Efecto de la neurotensina sobre los niveles extracelulares de aminoácidos acídicos en la corteza prefrontal de la rata despierta.* Tesis de Licenciatura, Madrid, Universidad Complutense (1992)

SANZ, B.; EXPOSITO, I. y MORA, F. Effects of neurotensin on the release of glutamic acid in the prefrontal cortex and striatum of the rat. *NeuroReport* 4: 1194-1196 (1993)

SARTER, M. y MARKOWITSCH, H.J. Convergence of the basolateral amigdaloid and mediodorsal thalamic projections in different areas of the frontal cortex in the rat. *Brain Res. Bull.* 10: 607-622 (1983)

SCHOEPP, D.D. y CONN, P.J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *TIPS* 14: 13-20 (1993)

SCHOTTE, A.; ROSTENE, W. y LADURON, P.M. Different subcellular localization of neurotensin-receptor and neurotensin-acceptor sites in the rat brain dopaminergic system. *J. Neurochem.* 50: 1026-1031 (1988)

SEEBURG, P.H. The TIPS/TINS lecture: The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *TINS* 14: 297-303 (1993)

SÉGUÉLA, P.; WATKINS, K.C. y DESCARRIES, L. Ultrastructural features of dopamine axon terminals in the anteromedial and the suprarhinal cortex of adult rat. *Brain Res.* 442: 11-22 (1988)

SEGOVIA, G. *Papel del óxido nítrico en la liberación de glutamato y GABA en el estriado e hipocampo de la rata consciente.* Tesis de Licenciatura, Universidad Complutense, Madrid (1995)

SEGOVIA, G; PORRAS, A y MORA, F. Effects of a nitric oxide donor on glutamate and GABA release in striatum and hippocampus of the conscious rat. *NeuroReport*, 5: 1937-1940 (1994)

SEIDEN, L.S.; SABOL, K.E. y RICAURTE, G.A. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 32: 639-677 (1993)

SEROOGY, K.B.; CECCATELLI, S.; SCHALLING, M.; HOKFELT, T.; FREY, P.; WALSH, J.; DOCKRAY, G.; BROWN, J.; BUCHAN, A. y GOLDSTEIN, M. A subpopulation of dopaminergic neurons in rat ventral mesencephalon contains both neurotensin and cholecystokinin. *Brain Res.* 455: 88-98 (1988)

SEROOGY, K.B; MEHTA, A. y FALLON, F.H. Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon: projections to forebrain. *Exp.Brain Res.* 68: 277-289 (1987)

- SESAK, S.R.; DEUTCH, A.Y.; ROTH, R.H. y BUNNEY, B.S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J.Comp.Neurol.* 290: 213-242 (1989)
- SHUTE, C.C.D. y LEWIS, P.R. The ascending cholinergic reticular system: Neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 90: 497-520 (1967)
- SIBLEY, D.R. y MONSMA, F.J.Jr. Molecular biology of dopamine receptors. *TIPS.* 13: 61-69 (1992)
- SILLITO, A.M.; SALT, T.E. y KEMP, J.A. Modulatory and inhibitory processes in the visual cortex. *Vision Res.* 25: 375-381 (1985)
- SMITH, R.J. y PANICO, K.A. Automated analysis of O-phthalaldehyde derivatives of amino acid in physiological fluids by reverse phase high performance liquid chromatography. *J.Liquid.Chromatogr.* 8: 1783-1795 (1985)
- SOPRONIEW, M.V.; CAMPBELL, P.E.; CUELLO, A.C. y ECKENSTEIN, F. Central cholinergic neurons visualized by immunohistochemical detection of choline acetyltransferase. En: *The rat nervous system.* Ed: G. Paxinos. Academic Press, Inc., Sydney: 471-486 (1985)
- SPENCER, D.G.J.R.; HORVATH, E. y TRABER, J. Direct autoradiographic determination of muscarinic M1 and M2 receptor sub-type distribution in the rat brain: relative binding patterns in cholinergic nuclei and projection areas. *Soc.Neurosci.Abstr.* 11: 1054 (1985)

- SPENCER, H.J. Antagonism of cortical excitation of striatal neurons by glutamic acid diethyl ester: evidence for glutamic acid as an excitatory transmitter in the rat striatum. *Brain Res.* 102: 91-101 (1976)
- SPRENGEL, R. y SEEBURG, P.H. The unique properties of glutamate receptor channels. *FEBS* 325(1,2): 90-94 (1993)
- STUDLER, J.M.; , P.; TRAMU, G.; HERVÉ, D.; GLOWINSKI, J. y TASSIN, J.P. Extensive colocalization of neurotensin with dopamine in the rat meso-cortical-frontal dopaminergic neurons. *Neuropeptides* 11: 95-100 (1988)
- TANAKA, K.; MASU, M. y NAKARISHI, S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4: 847-854 (1990)
- TASSIN, J.P.; , P.; TRAMU, G.; HERVE, D. y GLOWINSKI, J. Rat mesocortical dopaminergic neurons are mixed neurotensin-dopamine neurons: immunohistochemical and biochemical evidence. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 537: 531-533 (1988)
- THIERRY, A.M.; BLANC, G.; SOBEL, A.; STINUS, L. y GLOWINSKI, J. Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science* 182: 499-501 (1973)
- THIERRY, A.M.; LE DOURAIN, C.; PENIT, J.; FERRON, A. y GLOWINSKI, J. 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 (1986)

TUCEK, S. Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *J.Neurochem.* 44: 11-24 (1985)

TUCEK, S. Short-term control of the synthesis of acetylcholine. *Prog.Biophys.Molec.Biol.* 60: 59-69 (1993)

UHL, G.R.; KUHAR, M.J. y SNYDER, S.H. Neurotensin: immunohistochemical localization in the rat central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 74: 4059-4061 (1977)

UHL, G.R Y SNYDER, S.H. Regional and subcellular distribution of brain neurotensin. *Life Sci.* 19: 1827-1832

UNGERSTEDT, U. Introduction to intracerebral microdialysis. En: *Microdialysis in the Neurosciences.* Eds: T.E. Robinson y J.B. Justice. Elsevier, Amsterdam: 3-22 (1991)

VAN EDEN, C.G.; HOORNEMAN, E.M.D.; BUIJS, R.M.; MATTHIJSSSEN, M.A.H.; GEFFARD, M. y UYLIGS, H.B.M. Immunocytochemical localization of dopamine in the prefrontal cortex of the rat at the light and electron microscopical level. *Neuroscience* 22: 849-862 (1987)

VENEMA, K.; LEEVER, W.; BAKKER, J.O.; HAAYER, G. y KORF, J. Automated precolumn derivatization device to determine neurotransmitters and other amino acids by reverse phase high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 260: 371-376 (1983)

VERNEY, C.; ALVAREZ, C.; GBFFARD, M. y BERGER, B. Ultrastructural doble labelling study of dopamine terminals and GABA-containing neurons in the rat anteromedial cerebral cortex. *Eur.J.Neurosci.* 2: 960-972 (1990)

VICKENT, J.P. Neurotensin receptors. Binding, properties, transduction, mechanism, and purification. En: *The Neurobiology of Neurotensin*. Eds: P. Kitabgi, CB. Nemeroff. Annals of the New York Academy of Sciences, New York: 90-100 (1992)

VIDAL, C. y CHANGEAUX, J.P. Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience* 56: 23-32 (1993)

VILARA, M.T.; BODDEKE, H.W.G.M.; WIEDERHOLD, K.H.; KISCHKA, U.; MENGOD, G. y PALACIOS, J.M. Regional expression of muscarinic receptor (MChR) subtypes in rat brain: an in situ hybridization receptor autoradiography study. *TIPS*. 10: 115-116 (1989)

VIVES, F.; GAYOSO, M.J.; OSORIO, C. y MORA, F. Afferent pathways to points of self-stimulation in the medial prefrontal cortex of the rat as revealed by the horseradish peroxidase technique. *J.Chromatogr.* 260: 371-376 (1983)

WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P. y HONORÉ, T. Structure-activity relationships in the development of the excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol.Sci.* 11: 25-33 (1990)

WESTERINK, B.H.C. y JUSTICE, J.B. Microdialysis compared with other in vivo release methods. En: *Microdialysis in the neurosciences*. Eds: T.E. Robinson y J.B. Justice. Elsevier, Amsterdam: 23-43 (1991)

WHITTAKER, V.P. The storage and release of acetylcholine. *TIPS*. 6: 312-315 (1986)

XU, M.; MIZOBE, F.; YAMAMOTO, T. y KATO, T. Differential effects of M1- and M2-muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism in freely moving rats. *Brain Res.* 495: 232-242 (1989)

YAKSH, T.L. y YAMAMURA, H.I. Factors affecting performance of the push-pull cannula in brain. *J.Applied Physiol.* 37: 428-434 (1974)

YAMAMOTO, B.K. y DAVY, S. Dopaminergic modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis. *J.Neurochem.* 58: 1736-1742 (1992)

ZUKIN, R.S.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; KUSHNER, L.; LERMA, J.; HARING, R.; MCURK, J.F.; ROGINSKI, R. y BENNETT, M.V.L. Molecular biology of excitatory amino acids receptors. En: *Excitatory amino acids*. Eds: BS. Meldrun; F. Moroni; RP. Simon y JH. Woods. Raven Press, New York: 145-154 (1991)

1994 receptor and ion channel nomenclature supplement. *TIPS supp.* (1994)