



**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**NEUROTENSINA Y AUTOESTIMULACION EN LA CORTEZA  
PREFRONTAL DE LA RATA**

**RAIMUNDO SANTIAGO SABATER CANDELA**  
*Granada, Mayo 1994*

**José Manuel Rodríguez Ferrer, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,**

**CERTIFICA:** *Que la Tesis Doctoral titulada "Neurotensina y autoestimulación en la corteza prefrontal de la rata" que presenta D. Raimundo Sabater Candela para optar al título de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección.*

**Granada, 13 de Mayo de 1994**

**Fdo.: J.M.R. Ferrer**



Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a que el profesor don Francisco Mora Teruel me aceptó en su laboratorio; Manuela Cobo Aceituno, desde el principio, me enseñó a trabajar en él; José Antonio Saéz Moreno compartió el trabajo conmigo y el profesor don José Manuel Rodríguez Ferrer se encargó de dirigirlo.

La profesora María Inmaculada Rosa Montes Ramírez nos sugirió ideas y Maite Asenjo Plaza me ayudó a realizar algunos de los experimentos.

A todos, mi agradecimiento.

*Durante la realización de esta Tesis Doctoral, me ha sido permitido residir como médico en el Real Colegio Mayor San Bartolomé y Santiago. Quiero expresar mi agradecimiento en la persona de su Vicerrector don José Luis Pérez-Serrabona González, que me distinguió concediéndome la Beca de Colegial y su amistad.*

*Formar parte de la historia de éste Colegio es para mí un motivo de orgullo.*

*Dedico este trabajo a don Alfonso Verdú Tormo,  
maestro de mi niñez.*



*¿ Quién me contaría a mí  
de que está hecha la luna  
si de rosas y jazmines  
o de sábanas de cuna ?*

*(Bulerías de la luna llena)*

*Cuando la muerte quiera  
una verdad quitar de entre mis manos  
las hallará vacías, como en la adolescencia  
ardientes de deseos, tendidas hacia el aire.*

*L. Cernuda.*



## RESUMEN

Estudios farmacológicos y neuroquímicos han demostrado la participación de la dopamina, fundamentalmente a través de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, en el proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata (Mora y Myers, 1977; Ferrer, 1984). Recientemente, se ha descrito que, en este animal, la inmensa mayoría de las terminales dopaminérgicas que inervan la corteza prefrontal, y que forman parte del denominado sistema mesocortical dopaminérgico, también contienen neurotensina (Studler et al. 1988). Además, la estimulación eléctrica de las fibras mesocorticales dopaminérgicas produce una liberación de ambos neurotransmisores en la corteza prefrontal (Bean y Roth, 1992). Por otra parte, tanto los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> como los receptores de neurotensina presentes en la corteza prefrontal muestran una distribución muy similar en este área cerebral (Tassin et al., 1992). Estas evidencias, junto con el hecho de que en el sistema nervioso central existe una íntima relación funcional entre neurotensina y dopamina (Nemeroff, 1986), permiten sugerir la posible participación de la neurotensina en el sustrato neuroquímico que subyace al proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal de la rata. Precisamente, el dilucidar este punto ha sido el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral.

Para llevar a cabo este propósito, se han estudiado los efectos de la administración intracerebral de neurotensina en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial de la rata. Igualmente, se han estudiado los efectos de la administración de diversos análogos de la neurotensina como son la xenopsina, la neuromedina N y el fragmento neurotensina 1-11. Los resultados obtenidos indican que la administración intracerebral, en la propia corteza prefrontal medial, tanto de neurotensina, como de sus análogos xenopsina y neuromedina N, produce una inhibición específica del proceso de autoestimulación en este área cerebral, lo que nos ha permitido sugerir la participación de la neurotensina en el sustrato neuroquímico de dicho proceso. Las propiedades funcionales diferentes de la neuromedina N y del fragmento neurotensina 1-11, también nos han permitido descartar algunos de los posibles mecanismos que pudieran estar mediando los efectos producidos por la neurotensina.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

#### ARTICULOS

1. Ferrer, J.M.R., Sabater, R. and Sáez, J.A. Neuromedin N decreases self-stimulation of the medial prefrontal cortex. *Neuroreport*. 3: 1027-1029. (1992)
2. Ferrer, J.M.R., Sabater, R. and Sáez, J.A. Neurotensin participates in self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 231: 39-45. (1993).
3. Sabater, R., Sáez, J.A. and Ferrer, J.M.R. SCH 23390 decreases self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 242: 205-208. (1993).

#### COMUNICACIONES

1. Sabater, R., Sáez, J.A., Mora, F. and Ferrer, J.M.R. D1 dopamine receptor mediates self-stimulation of the prefrontal cortex in the rat. II Congreso de la SEN. Sevilla. España. (1989).
2. Sabater, R., Sáez, J.A. and Ferrer, J.M.R. D1 dopamine receptor and self-stimulation of the prefrontal cortex in the rat: effects of administration of SCH 23390. *European Journal of Neuroscience*. 3: 317. (1990).
3. Sabater, R., Sáez, J.A., Domínguez, I., Asenjo, M. and Ferrer, J.M.R. Neurotensin: the role and mechanism of action on self-stimulation of the prefrontal cortex in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 5: 8. (1992).
4. Sabater, R., Sáez, J.A., Asenjo, M., Domínguez, I., Villegas, I., Montes, R. and Ferrer, J.M.R. Effects of neurotensin (1-11) on self-stimulation in the medial prefrontal cortex in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 6: 138. (1993).



**INDICE**

<b>A. INTRODUCCION.</b> .....	1
<b>1. Autoestimulación:</b> .....	3
<b>1.1. Generalidades</b> .....	3
<b>1.2. Sustratos neuroanatómicos de la autoestimulación cerebral</b> .....	4
<b>1.2.1. Áreas que presentan autoestimulación cerebral</b> .....	4
<b>1.2.2. Vías y circuitos implicados en la autoestimulación cerebral</b> .....	4
<b>1.2.2.1. Fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral.</b> .....	6
<b>1.2.2.2. Área ventrosegmental-sustancia negra</b> .....	7
<b>1.2.2.3. Corteza prefrontal medial</b> .....	8
<b>1.3. Neuroquímica de la autoestimulación cerebral</b> .....	8
<b>1.3.1. Sistemas catecolaminérgicos centrales</b> .....	9
<b>1.3.2. Serotonina</b> .....	10
<b>1.3.3. Acetilcolina</b> .....	11
<b>1.3.4. Péptidos neurotransmisores</b> .....	11
<b>1.3.5. Aminoácidos neurotransmisores</b> .....	12
<b>2. Corteza Prefrontal</b> .....	13
<b>2.1. Descripción</b> .....	13
<b>2.2. Corteza prefrontal y autoestimulación</b> .....	15
<b>2.2.1. Estructuras vías y circuitos</b> .....	15
<b>2.3. Neuroquímica de la autoestimulación en la corteza prefrontal</b> .....	17
<b>2.3.1. Dopamina y noradrenalina</b> .....	19
<b>2.3.2. Serotonina y acetilcolina</b> .....	20



2.3.3. Péptidos neurotransmisores .....	21
2.3.3.1. Péptidos opiáceos .....	21
2.3.3.2. Sustancia P y Colecistoquinina .....	22
2.3.4. Aminoácidos neurotransmisores .....	22
3. Neurotensina .....	23
3.1. Generalidades .....	23
3.2. Funciones de la neurotensina en el sistema nervioso .....	22
3.3. Interacción neurotensina-dopamina en el sistema nervioso central .....	27
3.4. Neurotensina y corteza prefrontal .....	32
3.5. Neurotensina y autoestimulación .....	34
<b>B. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
1. Objetivos de la presente Tesis doctoral .....	39
<b>C. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>41</b>
1. Animales .....	43
2. Preparación de implantes cerebrales de cánulas y electrodos .....	43
3. Procedimiento quirúrgico estereotaxia .....	45
4. Métodos experimentales .....	49
4.1. Estimulación eléctrica cerebral .....	49
4.2. Obtención de autoestimulación cerebral .....	51
4.3. Microinyección intracerebral .....	52
5. Histología y análisis estadístico .....	55
6. Resumen de la metodología seguida en los experimentos realizados .....	56

<b>D. RESULTADOS</b> .....	59
1. Efectos de la administración intracortical de neurotensina sobre la autestimulación en la corteza prefrontal medial .....	65
2. Efectos de la administración intracortical de xenopsina sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial .....	71
3. Efectos de la administración intracortical de neuromedina N sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial .....	77
4. Efectos de la administración intracortical de neurotensina 1-11 sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial .....	81
<b>E. DISCUSION</b> .....	87
1. Sobre el diseño experimental .....	89
2. Sobre el papel de la neurotensina en la autoestimulación de la corteza prefrontal .....	90
3. Sobre el mecanismo de acción de la neurotensina en la autoestimulación de la corteza prefrontal .....	94
4. Interés del estudio presentado en esta Tesis .....	97
<b>F. CONCLUSIONES</b> .....	101
<b>G. BIBLIOGRAFIA</b> .....	105



**INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

### 1. AUTOESTIMULACION

#### 1.1. GENERALIDADES

La autoestimulación cerebral fue descrita por Olds y Milner en el año 1954 durante una investigación acerca de los efectos de la estimulación eléctrica en el área septal del cerebro de la rata (Olds y Milner 1954). Estos autores observaron que la rata volvía persistentemente al lugar en que previamente se le había administrado la estimulación. La atracción de la rata por la estimulación quedó demostrada con más objetividad al utilizar una caja de Skinner de manera que podía autoadministrarse un estímulo eléctrico siempre que presionaba una palanca. La autoestimulación cerebral consiste pues, en que un animal es capaz de aprender y ejecutar una conducta operacional, con objeto de obtener estimulación eléctrica de su propio cerebro a través de un electrodo implantado crónicamente.

La primera especie en la que se describió este fenómeno fue en la rata y en ella se han realizado la mayor parte de las investigaciones, sin embargo, también se ha demostrado su existencia en otras especies animales incluyendo otros mamíferos, peces y aves (Brady, 1960; Boyd y Gardner, 1962; Goodman y Brown, 1966). En 1960, Sem-Jacobsen y Torkildsen demostraron autoestimulación en el hombre.

De entre las diferentes estructuras cerebrales que sostienen autoestimulación existe una de especial relevancia, la corteza prefrontal. Este área cerebral se ha involucrado en funciones cognitivas, emocionales y de memoria (Fuster, 1989; Kolb, 1984). Alteraciones de la corteza prefrontal parecen acontecer en enfermedades mentales, en las que están particularmente afectadas las conductas motivadas, como es el caso de la esquizofrenia (Weinberger, 1988).

Se ha demostrado que la dopamina es parte fundamental, aunque no exclusiva, del sustrato neuroquímico de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata (Mora y Myers, 1977; Ferrer et al., 1983). En los últimos años se está observando un creciente interés en el estudio del papel neurotransmisor de la neurotensina. En este sentido, datos anatómicos, bioquímicos y conductuales, así como estudios clínicos, han demostrado una estrecha relación funcional entre neurotensina y dopamina en el sistema nervioso central en general y en la corteza prefrontal en particular (Nemeroff y Cain, 1985; Bean y Roth, 1992).

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral intenta esclarecer la participación o no de la neurotensina en el sustrato neuroquímico en que asienta la conducta de autoestimulación eléctrica cerebral en una zona determinada del cerebro: la Corteza Prefrontal Medial.



## 1.2. SUSTRATOS NEUROANATOMICOS DE LA AUTOESTIMULACION CEREBRAL.

### 1.2.1. AREAS QUE PRESENTAN AUTOESTIMULACION CEREBRAL.

Tras los estudios de mapeo, realizados en el cerebro de rata y las sucesivas revisiones de los mismos, llevadas a cabo por Olds y Olds (1965), Rolls (1974), Olds (1976), Olds y Fobes (1981) y Philips (1984), las áreas y estructuras cerebrales que sostienen autoestimulación en este animal se encuentran muy bien definidas. De estos estudios se deduce que, en la rata, las áreas que sostienen autoestimulación se distribuyen, en sentido cráneo-caudal, desde estructuras prosencéfalias hasta el tronco del encéfalo. Así, se ha podido obtener autoestimulación en cortezas prefrontal, entorrinal, retrosplenial y cingular, bulbo olfatorio, núcleos septales, caudado, amígdala, hipocampo, núcleo accumbens. En el diencéfalo ventral, las áreas que presentan autoestimulación tienden a concentrarse en el hipotálamo lateral, y en general a lo largo del fascículo prosencefálico medial, desde la banda diagonal de Broca hasta el área ventrotegmetal de Tsai. En el tronco del encéfalo se ha descrito autoestimulación en la sustancia gris central, sustancia negra, área ventrotegmetal, cerca del locus coeruleus, núcleos profundos del cerebelo y región parabraquial, región peribraquial del tegmento dorsal y en la región del núcleo del trigémino.

Más recientemente, Clavier y Gerfen (1982) han obtenido autoestimulación en distintos grupos talámicos; éstos son: núcleo dorsomedial (excepto el núcleo gelatinoso), núcleos intralaminares (centromedial, paracentral y central lateral), núcleos de la línea media (romboides, paratenial y paraventricular), núcleos ventrobasal y ventrolateral y grupos nucleares anteriores y posteriores. También se ha conseguido autoestimulación en ciertas estructuras cerebrales consideradas aversivas como el hipotálamo medial (Roberts, 1968; Schmitt et al., 1977), parte dorsal de la sustancia gris central mesencefálica, lemnisco medial, tegmentum lateral y formación reticular (Cazala, 1986).

En otras especies de vertebrados, se ha descrito una distribución anatómica similar de las áreas que sostienen autoestimulación.

### 1.2.2. VIAS Y CIRCUITOS IMPLICADOS EN LA AUTOESTIMULACION CEREBRAL.

Estudios neuroanatómicos, en los que se han determinado, mediante técnicas de marcaje neuronal anterógrado y/o retrógrado, las aferencias y eferencias de estructuras que presentan autoestimulación, han mostrado la existencia de conexiones recíprocas entre diversas áreas que soportan autoestimulación. Estudios posteriores, en los cuales se han utilizado técnicas electrofisiológicas, autorradiográficas con 2-desoxiglucosa, o de lesión electrolítica o neurotóxica, han tratado de dilucidar cuáles de las distintas conexiones que establece un área con otras están implicadas en la autoestimulación de la misma.

Los estudios electrofisiológicos y de detección del consumo de glucosa cerebral han puesto de manifiesto que la autoestimulación en un área cerebral activa a una

## INTRODUCCION

población de neuronas en otras áreas cerebrales que, en su mayor parte, también sostienen autoestimulación. Del mismo modo, durante la autoestimulación en cada una de éstas últimas áreas cerebrales se suelen activar, a su vez, neuronas en el área inicial (ver esquema 1). Estos resultados, junto con los aportados por los estudios en los que se han llevado a cabo lesiones selectivas de estructuras cerebrales, sugieren que en el sustrato neural de la autoestimulación en un área cerebral concreta participan vías y circuitos, que con menor o mayor complejidad conectan diversas estructuras entre sí.

---

**Autoestimulación en:****Activación en:**

---

- Hipotálamo lateral -----> Corteza prefrontal medial y sulcal y amígdala, septum, mesencéfalo y puente y corteza orbitofrontal, amígdala y sustancia innominata, en primate.
- Locus coeruleus -----> Corteza prefrontal medial y sulcal.
- Amígdala, n. accumbens,  
n. dorsomedial del Tálamo --> Corteza orbitofrontal del primate.
- Corteza orbitofrontal -----> Hipotálamo lateral, amígdala, globo pálido, sustancia  
(primate) innominata.
- Amígdala basolateral -----> Corteza orbitofrontal del primate, hipotálamo lateral,  
sustancia innominata.
- Accumbens, sustancia  
innominata,  
n. dorsomedial tálamo -----> Corteza orbitofrontal del primate, hipotálamo amígdala.

**ESQUEMA 1.** Este esquema resume la relación entre áreas de autoestimulación y áreas de registro de activación neuronal. Estos estudios han sido realizados mediante técnicas electrofisiológicas (Modificado de Cobo, 1990).

La mayoría de los estudios realizados se han centrado en tres estructuras: fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral, área ventro tegmental-sustancia negra y corteza prefrontal. Seguidamente, pasamos a describir los sustratos neuroanatómicos de la autoestimulación en el fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral y en el área ventro tegmental-sustancia negra, los relativos a la corteza prefrontal se mencionarán brevemente, ya que serán descritos con mayor extensión más adelante.



### 1.2.2.1. FASCICULO PROSENCEFALICO MEDIAL - HIPOTALAMO LATERAL.

Los estudios realizados con 2-desoxiglucosa han mostrado que durante la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral se activa una proyección bien definida que comienza en la banda diagonal de Broca y atraviesa el fascículo prosencefálico medial, lateral al núcleo preóptico, para dirigirse caudalmente al área ventroregmental (Gallistel et al., 1985). Por el contrario no se observa activación en núcleo caudado, núcleo accumbens, amígdala ni corteza prefrontal (Gallistel et al., 1985). Por su parte, los estudios electrofisiológicos confirman parcialmente lo anterior. Así, ha podido demostrarse que en la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial participan axones que descienden caudalmente desde el hipotálamo lateral hasta el área ventroregmental (Bielajew y Shizgal, 1986) y parecen originarse en neuronas cuyos cuerpos celulares se sitúan, entre otras estructuras, en el septum medial y la banda diagonal de Broca (Rompré y Shizgal, 1986). A diferencia de los estudios con 2-desoxiglucosa, estudios electrofisiológicos sí han descrito activación en corteza prefrontal y amígdala tras la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral (Rolls, 1972; Rolls y Cooper, 1973). Estos datos no excluyen la participación de las fibras ascendentes dopaminérgicas o serotoninérgicas en la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial pero sugieren, al igual que los estudios con 2-desoxiglucosa, que las fibras principalmente involucradas son las fibras descendentes que originándose en la banda diagonal de Broca terminan en el área ventroregmental.

Empleando técnicas de lesión electrolítica y/o neurotóxica se han confirmado los datos anteriores, cuestionándose la participación de las terminales dopaminérgicas ascendentes en la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral. Estos estudios han mostrado que la sección mecánica unilateral del fascículo prosencefálico medial a nivel de la comisura anterior, con la consiguiente lesión de las fibras dopaminérgicas, no modifican la autoestimulación en hipotálamo lateral (Janas y Stellar, 1987). Por el contrario, las secciones que interrumpen las fibras procedentes del área preóptica, banda diagonal de Broca y septum lateral sí modifican la autoestimulación en el hipotálamo lateral (Janas y Stellar, 1987; Waraczynski, 1988), confirmándose de esta manera que los axones implicados en la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral descienden atravesando hipotálamo lateral hasta el área ventroregmental y se originan en neuronas del septum medial, área preóptica y banda diagonal de Broca.

El hecho de que el efecto de las lesiones de las fibras no-dopaminérgicas descendentes, sea transitorio ha sugerido la participación de las neuronas intrínsecas en la autoestimulación del hipotálamo lateral (Volley et al., 1983; Waraczynski, 1988). Esto ha sido confirmado mediante la inyección de ácido iboténico (neurotoxina que destruye neuronas intrínsecas, pero respeta fibras de paso) en hipotálamo lateral. La administración unilateral de ácido iboténico en el hipotálamo lateral inhibe la autoestimulación en el hipotálamo ipsilateral y no tiene ningún efecto en el hipotálamo contralateral (Volley et al., 1983; Volley, 1985). Estos datos sugieren que las neuronas intrínsecas al hipotálamo lateral también están implicadas en la autoestimulación de dicha área.

En resumen, los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas descritas anteriormente sugieren que la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial-

## INTRODUCCION

hipotálamo lateral está mediada fundamentalmente por neuronas intrínsecas hipotalámicas así como por las fibras descendentes que atravesando el hipotálamo lateral se dirigen hacia el área ventrosegmental y, en menor medida, por fibras dopaminérgicas ascendentes.

### 1.2.2.2. AREA VENTROSEGMENTAL - SUSTANCIA NEGRA.

Mediante la técnica de marcaje neuronal retrógrado Hopkins (1976) mostró que las fibras de origen mesencefálico del fascículo prosencefálico medial (porción rostral) provienen en su mayor parte del área ventrosegmental y núcleos del rafe dorsal y en menor proporción, del locus coeruleus y sustancia negra. Entre las aferencias subcorticales a puntos de autoestimulación en la corteza prefrontal medial, de áreas que también sostienen autoestimulación, Vives et al. (1983) han descrito, entre otras, al área ventrosegmental y sustancia negra.

Empleando la técnica de tinción de Fink-Heimer, Huang y Routenberg (1971) mostraron que lesiones de puntos de autoestimulación del fascículo prosencefálico medial dan lugar a terminales degeneradas en sustancia negra y, si la lesión se localiza en puntos más mediales de dicho fascículo, en el área ventrosegmental. Con el empleo de técnicas autorradiográficas de aminoácidos marcados (35-S-metionina), Dalssas et al. (1981) han mostrado que la corteza prefrontal envía eferencias, entre otras estructuras, a área ventrosegmental y sustancia negra.

Los estudios realizados con 2-desoxiglucosa demuestran, como ya vimos, que durante la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral, se activa una proyección que partiendo de la banda diagonal de Broca atraviesa el fascículo prosencefálico medial lateral al núcleo preóptico para dirigirse caudalmente al área ventrosegmental (Gallister et al., 1985). Durante la autoestimulación en el área ventrosegmental también se ha observado activación de las fibras que cruzando el fascículo prosencefálico medial se dirigen a la banda diagonal de Broca (Porrino et al., 1984).

Takeichi et al. (1986) han realizado una serie de experimentos para dilucidar si son neuronas dopaminérgicas las responsables de la autoestimulación en dicha estructura o, por el contrario, son neuronas intrínsecas no-catecolaminérgicas. Estos autores realizaron inyecciones neurotóxicas tanto con 6-hidroxi-dopamina (neurotoxina que destruye selectivamente las neuronas catecolaminérgicas) como con ácido kaínico (neurotoxina de acción similar al ácido iboténico). La inyección unilateral de 6-hidroxi-dopamina en el área ventrosegmental de ratas adultas no produjo modificaciones de la autoestimulación y el estudio histológico confirmó la lesión de las neuronas catecolaminérgicas. Por el contrario, la inyección unilateral de ácido kaínico en el área ventrosegmental produjo una abolición de la autoestimulación durante los 14 días del experimento. Estos datos sugieren que las neuronas intrínsecas no-dopaminérgicas son el principal factor responsable de la autoestimulación en el área ventrosegmental. Es interesante señalar que las lesiones neonatales del sistema dopaminérgico con 6-hidroxi-dopamina producen un leve pero significativo descenso de la autoestimulación en el área ventrosegmental (Takeichi et al., 1986). En este sentido, la participación dopaminérgica en la autoestimulación de esta área no puede ser totalmente descartada.

En relación con la sustancia negra, se ha demostrado que lesiones neurotóxicas



del sistema nigroestriatal dopaminérgico producen un descenso de la autoestimulación en estriado (Phillips et al., 1976). Este descenso puede ser restaurado tras la implantación de sustancia negra fetal en el núcleo caudado (Fray et al., 1983). La lesión de la corteza prefrontal (sistema mesocortical dopaminérgico) disminuye la autoestimulación en la sustancia negra (Silverman y Corbett, 1989). Todo lo anterior sugiere la participación de las neuronas dopaminérgicas en la autoestimulación de éstas áreas cerebrales aún cuando estudios anteriores cuestionaron esta conclusión (Cooper et al., 1978; Phillips y Fibiger, 1978).

### 1.2.2.3. CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL.

Aunque este área será estudiada detenidamente más adelante, una serie de estudios, la mayoría de ellos realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que la autoestimulación de la corteza prefrontal medial implica la participación de neuronas intrínsecas (Ferrer et al., 1985), así como de aferencias procedentes del área ventro tegmental del mesencéfalo, núcleo dorsomedial del tálamo, amígdala y caudado putamen (Phillips y Fibiger, 1978; Ferrer, 1984; Ferrer et al., 1987; Vives et al., 1986) y de fibras eferentes que atravesando la cápsula externa se dirigen hacia las cortezas entorrinal y perirrinal (Cobo et al, 1989).

En conclusión, los resultados obtenidos en los estudios sobre el sustrato neural de la autoestimulación en el fascículo prosencefálico medial, área ventro tegmental-sustancia negra y corteza prefrontal, demuestran que en la autoestimulación de estas áreas participan fundamentalmente las neuronas intrínsecas a dichas áreas cerebrales así como diversas vías, tanto dopaminérgicas como no dopaminérgicas, que forman circuitos de mayor o menor complejidad. El hecho de que ninguna de las lesiones, salvo las selectivas de neuronas intrínsecas, disminuya permanentemente la autoestimulación del área estudiada apoya la hipótesis sugerida por Mora y Ferrer (1986) que propone que durante la autoestimulación de un área cerebral concreta se activan múltiples circuitos de forma que, tras la lesión de uno de ellos, el resto de los circuitos no dañados pueden compensar, al menos en parte, el déficit producido sobre la autoestimulación.

### 1.3. NEUROQUIMICA DE LA AUTOESTIMULACION CEREBRAL.

Conocidas las áreas que sostienen autoestimulación, así como los sustratos neurales de algunas de las mismas, otro de los objetivos principales de los estudios sobre autoestimulación cerebral ha sido el identificar los neurotransmisores implicados en dicho proceso. La coincidencia en la localización cerebral de los sistemas catecolaminérgicos centrales y de las estructuras cerebrales que presentan autoestimulación determinó que gran parte de los estudios iniciales sobre la neuroquímica de la autoestimulación tuvieran como objetivo dilucidar la participación de las catecolaminas en el proceso de autoestimulación cerebral. El resultado ha sido la evidencia de que las catecolaminas forman parte del sustrato neuroquímico en un gran número de las estructuras estudiadas. Estudios posteriores han demostrado la participación de otros neurotransmisores como la serotonina, la acetilcolina y, más recientemente, el grupo de los péptidos neurotransmisores (colecistoquinina, sustancia P y péptidos opiáceos) y el grupo de los aminoácidos neurotransmisores. Del conjunto de estos estudios se deduce que en la

## INTRODUCCION

autoestimulación de un área cerebral, no participa un único neurotransmisor sino varios que suelen estar interrelacionados entre sí.

### 1.3.1. SISTEMAS CATECOLAMINERGICOS CENTRALES.

Los estudios realizados para conocer la implicación de la dopamina y la noradrenalina en el sustrato neuroquímico de la autoestimulación han puesto de manifiesto que, si bien las pruebas que implican a la dopamina son concluyentes, aquellas otras que implican a la noradrenalina han sido muy rebatidas.

La coincidencia entre la localización de los sistemas dopaminérgicos centrales y las estructuras cerebrales que sostienen autoestimulación sugiere la participación de la dopamina en el sustrato neuroquímico de la autoestimulación cerebral. Así, se ha obtenido autoestimulación tanto en el origen del sistema nigroestriatal, mesolímbico y mesocortical como en áreas terminales de dichos sistemas (Olds y Fobes, 1981; Phillips, 1984).

Los estudios neurofarmacológicos han apoyado esta hipótesis dopaminérgica al demostrar que drogas que actúan sobre el metabolismo de las catecolaminas modifican la autoestimulación cerebral (Mora et al., 1975; Ferrer et al., 1983; Olds y Fobes, 1981; Gallistel y Freyd, 1987). Así, se ha demostrado que la administración tanto sistémica como intracerebral de neurolépticos produce una disminución específica de la autoestimulación en fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral, área ventro tegmental, corteza prefrontal medial y sustancia gris central; (Mora et al., 1975, 1976; Mora et al., 1977; Franklin, 1978; Ferrer et al., 1983; Nakajima y McKenzie, 1986; Miliarensis et al., 1986; Stellar y Corbett, 1989). Por el contrario la administración de anfetamina facilita la autoestimulación (Gallistel y Freyd 1987).

La participación de la dopamina en la autoestimulación cerebral se ha visto también apoyada por la evidencia de que la lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas con 6-hidroxi dopamina produce un descenso de la tasa de autoestimulación en diversas áreas con presencia de terminales dopaminérgicas como la corteza prefrontal o el núcleo caudado. Además, se ha visto que el déficit de la autoestimulación observado tras la depleción dopaminérgica del núcleo caudado con 6-hidroxi dopamina puede ser restaurado tras realizar un implante de sustancia negra fetal en el núcleo caudado (Fray et al., 1983).

Actualmente, se conoce la existencia de varios tipos de receptores dopaminérgicos, que se clasifican en dos grandes grupos: D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Sibley, et al., 1993). Inicialmente, Gallistel y Davis (1983) sugirieron la participación de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> en la autoestimulación del fascículo prosencefálico medial. No obstante, posteriormente se ha implicado más a los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> en la autoestimulación tanto del fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral (Nakajima et al., 1986) como del área ventro tegmental, corteza prefrontal medial y núcleo dorsal del rafe (Ferrer et al., 1983; Nakajima et al., 1986). Más recientemente, Nakajima y Baker (1989) han involucrado a ambos tipos de receptores (D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) en la autoestimulación del área ventro tegmental sugiriendo que, en este área, una activación de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> genera un efecto de refuerzo y que este efecto se expresa sólo si los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> están activados a un nivel óptimo. En resumen, los datos



anteriormente descritos apoyan la participación de la dopamina en la autoestimulación cerebral. La participación dopaminérgica en la autoestimulación cerebral implica tanto a los receptores  $D_1$  como  $D_2$ , aún cuando existen ciertas diferencias regionales en el predominio de uno u otro tipo de receptor.

Se puede concluir por tanto que, los estudios neuroquímicos y neurofarmacológicos, apoyan la participación de la dopamina en la autoestimulación cerebral e igualmente de estos estudios parece derivarse la existencia de diferencias regionales en cuanto al tipo de receptor dopaminérgico implicado.

La dopamina, sin embargo, no parece ejercer sobre la autoestimulación una acción exclusiva como neurotransmisor, ya que no sólo se ha obtenido autoestimulación en áreas exentas de dicho neurotransmisor, sino que además, la deplección de dopamina en áreas que sostienen autoestimulación no produce un descenso permanente de la autoestimulación en dichas estructuras (Simon et al., 1979; Unemoto et al., 1984; Takeichi et al., 1986).

En relación a la noradrenalina, aunque fue el primer neurotransmisor presuntamente implicado en la autoestimulación (Stein, 1968), su participación está actualmente muy cuestionada. A favor de la participación de la noradrenalina está el hecho de que se ha obtenido autoestimulación tanto en el origen de las vías noradrenérgicas como en sus terminales (Stein, 1968; Olds y Fobes, 1981; Phillips, 1984). Sin embargo la autoestimulación en el locus coeruleus, punto de origen de los principales sistemas noradrenérgicos, no se afecta tras la destrucción con 6-hidroxidopamina del mismo (Olds y Fobes, 1981). También, estudios farmacológicos que inicialmente indicaron la participación de la noradrenalina en la autoestimulación cerebral han sido posteriormente rebatidos. Así, diversos autores observaron que drogas que inhiben la síntesis de noradrenalina (como la  $\alpha$ -metil-paratirosina, el dietilditiocarbamato o el disulfirán) inhiben la autoestimulación y la administración intraventricular de noradrenalina, restaura dicho proceso (Wise y Stein, 1969; Ritter y Stein, 1973). Sin embargo, se ha demostrado que estos fármacos causan sedación en los animales (Roll, 1970; Fibiger, 1978). En este caso la restauración de la autoestimulación, tras la administración intraventricular de noradrenalina, parece deberse a la recuperación del estado normal de los animales por este neurotransmisor (Olds y Fobes, 1981). Estos resultados han cuestionado severamente la participación de la noradrenalina en el proceso de autoestimulación.

### 1.3.2. SEROTONINA.

Estudios farmacológicos han mostrado resultados diferentes sobre la participación de la serotonina en la autoestimulación cerebral en función del área estudiada. Así, se ha descrito que inyecciones intraventriculares de 5-hidroxitriptamina inhiben la autoestimulación en hipotálamo lateral (Wise et al., 1973) y que la paraclorofenilalanina, un bloqueante de la síntesis de serotonina, produce una facilitación de la autoestimulación en fascículo prosencefálico medial, hipotálamo lateral y área ventroregimental (Poschel y Ninteman, 1971; Van der Kooy et al., 1977), una disminución de la autoestimulación en caudado (Phillips et al., 1976) núcleos del rafe e hipocampo (Van der Kooy et al., 1977) o no afectación de la autoestimulación cerebral en la corteza prefrontal medial (Ramírez et al., 1983).

## INTRODUCCION

De igual forma, los efectos del metergolina, un antagonista de los receptores serotoninérgicos, varían según la estructura cerebral considerada. Así, inhibe la autoestimulación en la hipófisis y rafe medial (Nakajima, 1984), mientras que no produce modificaciones en la autoestimulación de hipotálamo lateral, área ventrotectal o núcleo dorsal del rafe (Nakajima y McKenzie, 1986).

Estos datos indican que aún cuando la serotonina participa en la autoestimulación de algunas áreas cerebrales como el núcleo caudado, hipocampo, hipófisis y rafe medial, se cuestiona su participación en otras como el hipotálamo lateral, área ventrotectal, núcleo dorsal del rafe o corteza prefrontal medial (Van der Kooy et al., 1977; Ramírez et al., 1983; Nakajima, 1984; Nakajima y McKenzie, 1986).

### 1.3.3. ACETILCOLINA.

La acetilcolina también ha sido implicada en la autoestimulación de diversas áreas cerebrales como el hipotálamo lateral, área ventrotectal y corteza prefrontal. Esta participación parece estar mediada por diferentes receptores según el área estudiada.

Así, la administración de nicotina, facilita la autoestimulación en hipotálamo y área ventrotectal, mientras que la administración de agonistas muscarínicos la inhibe (Pradhan y Bowling, 1971; Newnan, 1972; Wishart y Herberg, 1979; Druhan et al., 1989). Por el contrario, la administración de nicotina o mecamilamina (antagonista nicotínico) no producen ningún efecto sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial, mientras que la administración tanto de agonistas como de antagonistas muscarínicos inhibe la autoestimulación de dicha área cortical (Vives y Mora, 1986). Estos datos sugieren que, en corteza prefrontal medial, la participación de la acetilcolina está mediada selectivamente por los receptores muscarínicos, mientras que en el hipotálamo lateral y área ventrotectal involucra tanto a los receptores nicotínicos como a los muscarínicos.

### 1.3.4. PEPTIDOS NEUROTRANSMISORES.

Con el hallazgo de una serie de péptidos neurotransmisores en el sistema nervioso central, fundamentalmente endorfinas y encefalinas, así como la colecistoquinina y sustancia P, se ha abierto un nuevo campo en la neurotransmisión de la autoestimulación cerebral.

Los péptidos opiáceos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, habiéndose encontrado una alta densidad en hipotálamo, núcleo accumbens, sustancia gris central y locus coeruleus (Cuello, 1983). Además, existen receptores opiáceos y neuronas endorfinérgicas en muchas áreas cerebrales que sostienen autoestimulación (Olds y Fobes, 1981; Cuello, 1983).

La administración de agonistas y antagonistas de los receptores opiáceos modifican la autoestimulación en diferentes áreas del cerebro como el área ventrotectal, sustancia negra, sustancia gris central, núcleo paratenial, globus pallidus, fascículo prosencefálico medial, hipotálamo lateral y corteza prefrontal (Broekkhamp et al.,



1979; Nazzaro et al., 1981; Nelson et al., 1981; Shaw et al., 1984). Así, la morfina produce una facilitación de la autoestimulación en corteza prefrontal medial, hipotálamo, área ventrotegmenal, sustancia negra y sustancia gris central (Lorrens 1976; Liebman y Segal, 1977). Interesantemente, los efectos facilitadores de la morfina y encefalinas en el área ventrotegmenal son inhibidos cuando se bloquea la transmisión dopaminérgica (Broekkhamp et al., 1979), lo que ha permitido sugerir que la acción de estos péptidos en el proceso de autoestimulación cerebral puede estar mediada por los sistemas dopaminérgicos.

En relación con la colecistoquinina y la sustancia P, se ha demostrado que ambos péptidos se hallan presentes en estructuras que sostienen autoestimulación, como son la corteza prefrontal medial, área ventrotegmenal, hipotálamo, amígdala y mesencéfalo (Krieger, 1983). La administración intracerebral de sustancia P inhibe selectivamente la autoestimulación tanto del hipotálamo lateral (Cheramy et al., 1978) como de la corteza prefrontal (Ferrer et al., 1988) lo que sugiere su participación en el sustrato neuroquímico implicado en la autoestimulación de dichas áreas. Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han mostrado que la sustancia P interactúa con la dopamina en estructuras cerebrales donde ambos neurotransmisores están presentes (Cheramy et al., 1978; Elliot et al., 1986). En este sentido existen evidencias que permiten sugerir que la participación de la sustancia P en la autoestimulación de hipotálamo lateral y corteza prefrontal medial puede estar mediada, al menos en parte, a través de su actuación sobre los sistemas dopaminérgicos (Cheramy et al., 1978; Ferrer et al., 1988).

En relación a la colecistoquinina, Kornblith et al. (1978) han demostrado que la administración intracerebral de dicho péptido inhibe la autoestimulación en hipotálamo lateral y locus coeruleus. Por el contrario, inyecciones tanto intraventriculares como intracorticales de colecistoquinina realizadas en la corteza prefrontal medial, no modifican la autoestimulación en dicha área cortical (Ferrer et al., 1988).

Estos resultados muestran que tanto los péptidos opiáceos como la colecistoquinina y la sustancia P participan en la autoestimulación cerebral de determinadas áreas cerebrales.

### 1.3.5. AMINOACIDOS NEUROTRANSMISORES

Aparte de su función metabólica y estructural, algunos aminoácidos tienen acciones neurotransmisoras, como los aminoácidos acídicos (aspártico y glutámico) y el GABA que han sido los más estudiados. Estos aminoácidos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984). No obstante, existen variaciones apreciables de unas áreas cerebrales con respecto a otras. Así, el hipotálamo, la sustancia negra y el núcleo pálido son las áreas con mayor contenido endógeno de GABA (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984) mientras que los niveles máximos de glutámico se localizan en el lóbulo piriforme y la corteza que rodea a la cisura de Silvio (Johnson y Aprison, 1971). También se han encontrado altos niveles de glutámico en estriado y corteza somatosensorial (Johnson y Aprison, 1971).

En relación con la participación de los aminoácidos neurotransmisores en el proceso de autoestimulación se ha descrito un descenso de la autoestimulación en

## INTRODUCCION

hipotálamo lateral tras la administración de agonistas gabérgicos (Backus et al., 1988). Sin embargo, estas sustancias producen modificaciones en la actividad motora del animal lo que impide extraer conclusiones sobre la selectividad de estos resultados. Más recientemente, y de una manera más convincente, Cobo (1989) ha demostrado la participación del ácido glutámico en la autoestimulación de la corteza prefrontal (ver más adelante).

## 2. CORTEZA PREFRONTAL.

### 2.1. DESCRIPCION

La corteza prefrontal es el área del neocórtex de más reciente adquisición, tanto filogenética como ontogénicamente y presenta su mayor grado de desarrollo en el ser humano (Fuster, 1989). Esta región cortical ha sido definida como el área del polo frontal que recibe las proyecciones del núcleo dorsomedial del tálamo (Leonard, 1969). En la corteza prefrontal de la rata, Leonard (1969) distinguió dos regiones perfectamente diferenciadas: la corteza prefrontal medial y la corteza prefrontal sulcal (figura 1). Posteriormente Krettek y Price (1977a) ampliaron los estudios iniciales de Leonard y observaron que las proyecciones del núcleo dorsomedial del tálamo a la corteza prefrontal presentan una estricta sistematización topográfica, localizándose preferentemente en la capa III y, en menor proporción, en las capas corticales I y VI.

Además de las aferencias procedentes del núcleo dorsomedial del tálamo utilizadas para definir la corteza prefrontal, este área cortical establece conexiones tanto aferentes como eferentes con otras muchas estructuras situadas en corteza, prosencéfalo basal, tálamo, hipotálamo y mesencéfalo (Divac et al., 1978; Beckstead, 1979; Dalssas et al., 1981; Vives et al., 1983).

En la corteza prefrontal se han localizado la mayoría de los neurotransmisores conocidos en la actualidad. Concretamente, se ha demostrado la localización en esta área cortical de dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina, péptidos neurotransmisores (colecistokinina, sustancia P, encefalinas, neurotensina, neurofisina, somatostatina, bombesina y neuropeptido Y) y aminoácidos neurotransmisores (GABA, ácido aspártico y glutámico) (Ferrer, 1984; Mora y Ferrer, 1986; Cobo, 1990)

La corteza prefrontal es un área de creciente interés en Neurobiología dada su participación en funciones cognitivas, mnésicas y motivacionales (Kolb, 1984; Fuster, 1989). Así, se ha descrito que la lesión de esta área cortical origina alteraciones de la orientación temporo-espacial y de la memoria a corto plazo (Kolb, 1984; Fuster, 1989). Igualmente se ha involucrado en procesos patológicos como las demencias preseniles (Candy et al., 1983) y la esquizofrenia (Weinberger, 1988).





**FIGURA 1.** Fotografías de secciones coronales del polo frontal de la rata. Las flechas indican los límites entre las distintas áreas corticales. la corteza prefrontal medial la componen las áreas: precentral medial (PrCm), cingular anterior (Ac), prelímbica (PL). La corteza prefrontal sulcal la componen las áreas: orbital ventral (VO, VLO) y lateral (LO) y agranular insular ventral (AIv) y dorsal (AId). (Tomado de Krettek y Price, 1977a)

## 2.2. CORTEZA PREFRONTAL Y AUTOESTIMULACION.

Routenberg (1971) en un estudio de mapeo sistemático demostró que, en la corteza frontal, sólo soportan autuestimulación cerebral aquellas dos áreas definidas como corteza prefrontal (medial y sulcal de Leonard). Además, la corteza prefrontal en sus dos subdivisiones, es la única área del neocortex que sostiene autoestimulación en la rata (Routenberg, 1971; Routenberg y Sloan, 1972). Para dilucidar los sustratos neuroanatómicos y neuroquímicos que subyacen a la autoestimulación de la corteza prefrontal medial se han realizado un gran número de trabajos. Así, los estudios neuroanatómicos han mostrado la participación de las neuronas intrínsecas y de ciertas vías tanto aferentes como eferentes en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial (Ferrer et al., 1985; Ferrer et al., 1987; Cobo et al., 1989). Los estudios neuroquímicos, por su parte, han sugerido la participación de varios de los neurotransmisores presentes en la corteza prefrontal medial. Concretamente, la dopamina, la acetilcolina, los péptidos opáceos y la sustancia P (Ferrer, 1984; Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990).

### 2.2.1. ESTRUCTURAS VIAS Y CIRCUITOS.

Tras los estudios iniciales de Routenberg (1971) mostrando que ambas subdivisiones de la corteza prefrontal sostienen autoestimulación, se han llevado a cabo diferentes estudios, neuroanatómicos de marcaje neuronal anterógrado y retrógrado, electrofisiológicos y de lesión electrolítica y neuroquímica, a fin de describir el sustrato anatómico de la autoestimulación en esta área del cerebro. A continuación se detallan las estructuras y vías relacionadas con el proceso de autoestimulación en dicha área cerebral.

Dalsass et al. (1981), mediante técnicas de transporte axonal anterógrado con 35-S-metionina, han mostrado las eferencias de puntos de la corteza prefrontal medial en los que se ha obtenido autoestimulación. Por otra parte, Vives et al. (1983), utilizando la técnica de transporte axonal retrógrado de la peroxidasa del rábano, han descrito las aferencias a puntos de autoestimulación en dicha estructura cerebral. Estos estudios han mostrado que las neuronas de la corteza prefrontal reciben aferencias y mandan eferencias a numerosas áreas corticales, talámicas, hipotalámicas, mesencefálicas y pontinas. De ambos estudios se deduce que zonas que presentan autoestimulación en la corteza prefrontal medial establecen conexiones, la mayoría de las veces recíprocas, con estructuras en las que previamente ha sido descrito que sostienen asimismo autoestimulación. Estas son: corteza prefrontal sulcal, hipotálamo, zona incierta, amígdala, sustancia negra, área ventrotectal, núcleos del rafe, sustancia gris periacueductal, caudado putamen, locus coeruleus y diversos núcleos talámicos incluyendo al núcleo dorsomedial del tálamo. No obstante, existen excepciones entre las que cabe destacar las conexiones con el claustrum, septum y núcleo accumbens, estructuras con las que la corteza prefrontal sólo parece que establece conexiones eferentes.

Los estudios electrofisiológicos realizados en rata y primate, han mostrado la activación de neuronas en ambas subdivisiones de la corteza prefrontal durante la autoestimulación de diferentes áreas cerebrales (Ito y Olds, 1971; Rolls y Cooper, 1973; Rolls, 1975; Mora et al., 1980; Rolls et al., 1980). Concretamente, durante la autoestimulación del hipotálamo lateral, locus coeruleus, núcleo accumbens, amígdala y



núcleo dorsomedial del tálamo. Esta activación es, en parte, recíproca ya que durante la autoestimulación en la corteza orbitofrontal del primate se activan neuronas en hipotálamo lateral, amígdala, núcleo caudado y sustancia innominata (Rolls et al., 1980).

La destrucción neuroquímica de las neuronas intrínsecas prefrontales, mediante la microinyección de ácido kaínico o iboténico, abole casi completamente la autoestimulación en esta área cortical (Ferrer et al., 1985; Nassif et al., 1985). Esta abolición se mantiene tanto tras la inyección de anfetamina como tras el incremento de la intensidad de la estimulación (Ferrer et al., 1985). De igual forma, la inyección de ácido kaínico en la otra subdivisión de la corteza prefrontal, la corteza prefrontal sulcal, también abole la autoestimulación en esta última área cortical (Gerfen y Clavier, 1981). Estos estudios sugieren que las neuronas intrínsecas a ambas subdivisiones de la corteza prefrontal son fundamentales para la autoestimulación en dicha área cortical.

Se podría esperar que la lesión de cada uno de los núcleos que mantienen relaciones recíprocas con la corteza prefrontal debería modificar la autoestimulación en éste área cortical. Sin embargo, los resultados obtenidos varían dependiendo del área cerebral lesionada. Así, lesiones del locus coeruleus, núcleo accumbens, zona incierta, fascículo prosencefálico medial-hipotálamo lateral o corteza prefrontal sulcal no modifican la autoestimulación en la corteza prefrontal medial (Corbett y Wise, 1980; Corbett et al., 1982; Ramírez et al., 1983; Ferrer, 1984; Robertson et al., 1986a; Cobo et al., 1989). Por el contrario, La lesión del núcleo caudado putamen, núcleo dorsomedial del tálamo, amígdala basolateral o área ventroregmental produce un descenso de la autoestimulación que se mantiene entre 3-6 días en el caso de las tres primeras estructuras mencionadas y 21 días en la última (Phillips y Fibiger, 1978; Vives et al., 1986; Ferrer et al., 1987). Recientemente, Cobo et al., 1989, han demostrado que la lesión, a nivel de la cápsula externa, de fibras eferentes prefrontales que se dirigen a las cortezas perirrinal y entorrinal produce un descenso selectivo de la autoestimulación de la corteza prefrontal medial.

Basándose en el hecho de que ninguna de las lesiones produce un descenso permanente de la autoestimulación, Mora y Ferrer (1986) han propuesto que la activación de varios núcleos interconectados entre sí (circuito complejo) puede ser la responsable de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata. De esta forma, tras la lesión de un único componente del circuito, el resto de las estructuras no dañadas pueden compensar el déficit producido sobre la autoestimulación (Mora y Ferrer, 1986). Concretamente, estos autores han sugerido la participación de varios circuitos complejos en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial (figura 2), destacando la importancia de dos de ellos:

- 1.- Corteza prefrontal medial-amígdala basolateral-núcleo dorsomedial del tálamo-corteza prefrontal medial.
- 2.- Corteza prefrontal medial-corteza entorrinal-área ventroregmental-corteza prefrontal medial.

La participación de primer circuito en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial ha sido propuesta en base a tres hechos: primero la corteza prefrontal medial, la amígdala basolateral y el núcleo dorsomedial de tálamo están recíprocamente interconectados (Krettek y Price, 1977a,b; Divac et al., 1978; Beckstead, 1979; Dalssas

## INTRODUCCION

et al., 1981; Sarter y Markowitsch, 1983a; Vives et al., 1983). Segundo, las tres estructuras soportan autoestimulación (Wurtz y Olds, 1963; Routenberg, 1971; Clavier y Gerfen, 1982). Tercero, mediante la técnica de la 2-desoxiglucosa, se ha detectado una elevada actividad metabólica en amígdala y núcleo dorsomedial del tálamo durante la autoestimulación en la corteza prefrontal medial (Yadin et al., 1983). El circuito formado por estas tres estructuras fué denominado por Livingston y Escobar (1971) *circuito límbico basolateral* y ha sido involucrado en aprendizaje y memoria (Livingstone y Escobar, 1971; Sarter y Markowitsch, 1983b). Para dilucidar la participación de dicho circuito en la autoestimulación, se realizaron lesiones simultáneas de amígdala basolateral y núcleo dorsomedial del tálamo. Tras la lesión se observó un descenso de la autoestimulación mayor que el obtenido tras la lesión simple de cada una de dichas estructuras (Ferrer et al., 1987).

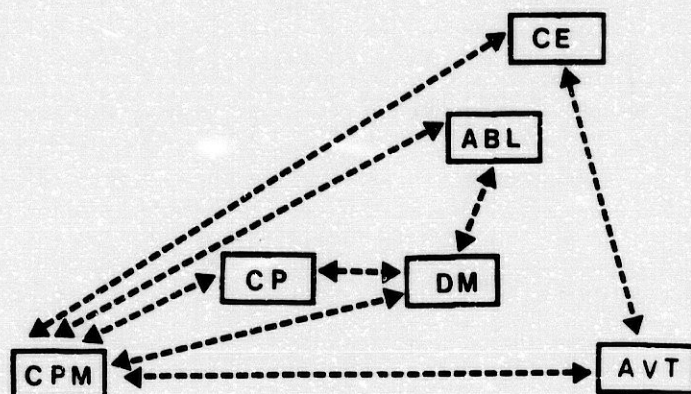
En relación al segundo circuito, se ha observado la existencia de una interconexión recíproca entre las tres estructuras (corteza prefrontal medial, corteza entorrinal y área ventro tegmental), y todas ellas sostienen autoestimulación (Routenberg, 1971; Collier et al., 1977; Beckstead, 1979; Dalssas et al., 1981; Vives et al., 1983). Igualmente se ha observado una alta actividad metabólica en la corteza entorrinal, una de las áreas terminales de la vía prefronto-cortical, durante la autoestimulación en la corteza prefrontal medial (Yadin et al., 1983). Además, tanto la lesión de esta vía cortico-cortical a distintos niveles (cápsula externa y corteza entorrinal) como la lesión de las proyecciones dopaminérgicas procedentes del área ventro tegmental producen un descenso de la autoestimulación (Phillips y Fibiger, 1978; Corbett et al., 1982; Robertson et al., 1986; Vives et al., 1986; Cobo et al., 1989). Todos estos datos sugieren la participación de este circuito en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial.

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

### 2.3. NEUROQUIMICA DE LA AUTOESTIMULACION EN LA CORTEZA PREFRONTAL.

La corteza prefrontal contiene la mayoría de los neurotransmisores localizados en el sistema nervioso central, incluyendo monoaminas, péptidos y aminoácidos (Ferrer, 1984; Mora y Ferrer, 1986). Además, se ha descrito coexistencia de varios neurotransmisores en las mismas terminales sinápticas corticales (Docherty et al., 1987; Studler et al., 1988).





**FIGURA 2.** Representación de aquellos circuitos presuntamente implicados en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial. Abreviaturas: ABL, amígdala basolateral; DM, núcleo dorsomedial del tálamo; CPM, corteza prefrontal medial; AVT, área ventrotegmental; CP, caudado putamen; CE, corteza entorrinal.

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

### 2.3.1. DOPAMINA Y NORADRENALINA.

La corteza prefrontal en sus dos subdivisiones (medial y sulcal) recibe terminales dopaminérgicas y noradrenérgicas procedentes de la porción rostromedial del área ventrotégmental y del locus coeruleus respectivamente (Ungerstedt, 1971). Las fibras originadas en estas áreas constituyen el sistema mesocortical dopaminérgico y el sistema noradrenérgico dorsal. Las terminales de estas fibras en la corteza prefrontal medial presentan una sistematización topográfica bien definida. Así, las terminales dopaminérgicas se localizan fundamentalmente en las capas profundas (V y VI) a diferencia de las noradrenérgicas que se concentran en las capas más superficiales (I-III) (Berger et al., 1976; Thierry et al., 1976; Lindvall y Bjorklund, 1984).

Estudios neurofarmacológicos iniciales sugirieron la posibilidad de que la dopamina estuviese involucrada en la autoestimulación de la corteza prefrontal (Mora et al., 1976). Estos estudios mostraron que antagonistas de los receptores dopaminérgicos, tales como el spiroperidol, haloperidol y pimozide, producen una inhibición dosis-relacionada de la autoestimulación en la corteza orbitofrontal del mono rhesus. Efectos similares se obtuvieron en la corteza prefrontal medial de la rata (Mora, 1978; Ferrer, 1984). La administración subcutánea de apomorfina, un agonista de los receptores dopaminérgicos, también produce un descenso dosis relacionado de la autoestimulación tanto en la corteza prefrontal de la rata (Mora et al., 1976; Ferrer et al., 1983) como en la corteza orbitofrontal del mono rhesus (Phillips et al., 1979). Otro fármaco empleado en los estudios farmacológicos ha sido la D-anfetamina, droga que produce una liberación de dopamina así como una inhibición de su recaptación. Concretamente, se ha mostrado que la administración de D-anfetamina produce una facilitación de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial aún cuando, esta facilitación es menor que en otras áreas cerebrales como el hipotálamo lateral (Goodall y Carey, 1975; Robertson y Mogenson, 1979). En 1977, Mora y Myers demostraron que durante la autoestimulación en la corteza prefrontal se produce un aumento de más del 100% en la liberación de dopamina en esta área cortical.

Estudios electrofisiológicos han mostrado que tanto la apomorfina como la L-dopa y la anfetamina, inhiben la tasa de disparo espontáneo en neuronas localizadas en áreas de la corteza prefrontal que soportan autoestimulación (Mora et al., 1976). Estos resultados fueron confirmados por Bunney y Aghajanian (1976) mediante la aplicación iontoforética de dopamina y apomorfina en la corteza prefrontal de la rata. Más recientemente, Ferrer et al. (1984) han mostrado que la estimulación *in vivo* del área ventrotégmental, origen de las terminales dopaminérgicas de la corteza prefrontal medial, también disminuye la tasa de disparo espontáneo de las neuronas de la corteza prefrontal. Este efecto es inhibido por el sulpiride, un antagonista dopaminérgico (Thierry et al., 1986).

Estudios farmacológicos realizados en nuestro laboratorio apoyan la participación de la dopamina en la autoestimulación de la corteza prefrontal y sugieren que los receptores envueltos en la mediación dopaminérgica son los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, pero no los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> (Ferrer et al., 1983), aún cuando ambos tipos de receptores están presentes en esta área cortical (Iversen et al., 1980). Así, la administración tanto intraperitoneal como intracortical de agonistas y antagonistas de los



receptores dopaminérgicos  $D_2$ , no modifica la autoestimulación en la corteza prefrontal medial. Sin embargo, la microinyección de fármacos que actúan sobre los dos tipos de receptores dopaminérgicos produce una atenuación selectiva de la autoestimulación (Ferrer et al., 1983).

Los resultados obtenidos tras los estudios farmacológicos y neuroquímicos sugieren la participación de la dopamina en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial. Estos resultados, además, se ven apoyados por el hecho de que tanto la lesión del área ventrotectal, origen del sistema mesocortical, como la deplección de dopamina producida tras la lesión neurotóxica de dicho sistema, producen un descenso de la autoestimulación que se mantiene durante 21 días (Phillips y Fibiger, 1978; Vives et al., 1986).

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

En relación a la noradrenalina, se ha mostrado que la administración tanto de agonistas como de antagonistas  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos (clonidina, isoproterenol, fenoxibenzamina y propanolol) no produce ningún efecto sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial (Ramírez et al., 1983). Igualmente, la lesión del locus coeruleus, origen de la vía noradrenérgica dorsal, no modifica la autoestimulación en dicha área cortical (Ramírez et al., 1983). Estos datos han sugerido que la noradrenalina no participa en el sustrato neuroquímico de la autoestimulación en este área del cerebro.

### 2.3.2. SEROTONINA Y ACETILCOLINA.

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

En relación con la acetilcolina, se ha demostrado que este neurotransmisor se localiza preferentemente en las capas profundas de la corteza prefrontal coincidiendo con las terminales dopaminérgicas (Emson, 1978). La interacción dopamina-acetilcolina, además, ha sido involucrada en la autoestimulación de otras áreas del cerebro (Stephens y Herberg, 1979).

A diferencia de la serotonina, La acetilcolina, sí ha sido involucrada en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial (Mora et al., 1980; Vives y Mora, 1986).

## INTRODUCCION

Así, la administración de escopolamina, bloqueante de los receptores muscarínicos, produce un descenso dosis-relacionado de la autoestimulación en este área cortical (Mora et al., 1980b). Este descenso no se acompaña de alteraciones motoras del animal. El mismo efecto se observó tras la administración de dexetimide, antagonista muscarínico, y tras la inyección de un agonista muscarínico, la pilocarpina (Mora et al., 1980b; Vives y Mora, 1986). Estos datos han sugerido que son los receptores muscarínicos los que median la participación de la acetilcolina en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial. Sin embargo, es posible que la participación de la acetilcolina en la autoestimulación de la corteza prefrontal se produzca de forma indirecta, ya que las inyecciones anteriores se realizaron a nivel periférico.

### 2.3.3. PEPTIDOS NEUROTRANSMISORES.

En la corteza prefrontal existen neuronas y/o terminales que contienen péptidos como la sustancia P, colecistoquinina, neurofisina, encefalinas, somatostatina, bombesina, péptido intestinal vasoactivo y neuropéptido Y, así como diversos tipos de receptores opiáceos (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990). No obstante, el origen de los diferentes sistemas peptidérgicos todavía no está bien definido.

Los estudios neurofarmacológicos relativos a la implicación de péptidos en el proceso de autoestimulación de la corteza prefrontal se han centrado en tres tipos de péptidos: péptidos opiáceos, colecistoquinina y sustancia P. Estos estudios han mostrado que la colecistoquinina no participa en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial (Ferrer et al., 1988). Los péptidos opiáceos pueden jugar un papel, aunque indirecto (Shaw et al., 1984), mientras que la sustancia P sí está involucrada en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial (Ferrer et al., 1988).

#### 2.3.3.1. PEPTIDOS OPIACEOS.

El primer estudio sobre los efectos de los péptidos opiáceos en relación a la autoestimulación en la corteza prefrontal fue realizado por Lorens (1976). Este estudio mostró que la inyección sistémica de morfina posee un efecto bifásico con un componente inicial inhibitorio no específico seguido de una facilitación específica de la autoestimulación. Estudios posteriores realizados por Shaw et al. (1984), utilizando inyecciones intraventriculares de morfina, confirmaron estos resultados. Este efecto facilitatorio puede ser revertido tras la administración de naloxona, antagonista de los receptores opiáceos (Shaw et al., 1984). Sin embargo, la microinyección intracerebral de morfina en la propia corteza prefrontal no tiene efectos sobre la autoestimulación de dicha área cortical (Shaw et al., 1984). De igual manera, mientras la administración sistémica de naloxona produce un descenso significativo de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial (Franklin y Robertson, 1982), la microinyección intracerebral de dicha droga no modifica la autoestimulación en esta área cerebral (Shaw et al., 1984).

Estos resultados sugieren que los efectos producidos tanto por la morfina como por la naloxona, no se deben a su actuación directa a nivel de la corteza prefrontal sino, posiblemente, a su actuación sobre las neuronas de otras áreas cerebrales (Shaw et al.,



1984). El área ventrotegmenal provee de dopamina a la corteza prefrontal y en ella se ha descrito una interacción dopamina-péptidos opiáceos (Broekkamp et al., 1979; Kelley et al., 1980). Además, la microinyección de morfina en el área ventrotegmenal facilita la autoestimulación en dicha área cerebral (Rompré y Wise, 1989). En base a estos datos se ha sugerido que los efectos de los péptidos opiáceos pueden ser debidos a su actuación sobre las neuronas del área ventrotegmenal (Shaw et al., 1984).

#### 2.3.3.2. SUSTANCIA P Y COLECISTOQUININA.

La corteza prefrontal es posiblemente el área cortical que posee la más alta concentración de sustancia P (Cuello y Kanazawa, 1978). Este péptido se localiza, al igual que la dopamina y la acetilcolina, en las capas corticales profundas (V y VI) (Emson, 1978; Sakanaka et al., 1983; Shults et al., 1984). La microinyección intracortical e intraventricular de sustancia P produce un descenso de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial (Ferrer et al., 1988), inyecciones similares no modificaron la actividad motora espontánea de los animales ni la autoestimulación en la corteza prefrontal contralateral a la inyección. Estos datos indican que la sustancia P participa en la autoestimulación de esta área cortical (Ferrer et al., 1988).

Actualmente, se conoce la interacción de sustancia P y dopamina en estructuras cerebrales donde están presentes ambos neurotransmisores (Cheramy et al., 1978; Eison et al., 1982) y se ha sugerido que la sustancia P juega un papel modulador sobre las neuronas del sistema mesocortical dopaminérgico (Elliot et al., 1986). Además, como se ha mencionado anteriormente, ambos neurotransmisores están presentes en las mismas capas corticales (Emson, 1978; Sakanaka et al., 1983). Estos datos han sugerido la existencia de una posible interacción sustancia P-dopamina en relación a la autoestimulación en la corteza prefrontal medial (Ferrer et al., 1988).

En relación con la colecistoquinina, se ha descrito que la corteza prefrontal presenta una alta densidad de dicho neuropéptido y que éste se halla localizado tanto en interneuronas como en algunas de las terminales dopaminérgicas. Todo esto hacía suponer su posible participación en el sustrato neuroquímico de la autoestimulación de esta área cortical. Sin embargo, la microinyección intraventricular e intracortical de colecistoquinina no modifica la autoestimulación en la corteza prefrontal medial (Ferrer et al., 1988). Las dosis empleadas en este estudio producen tanto efectos bioquímicos como conductuales (Myers y McCaleb, 1981; Crawley et al., 1985). Igualmente, dosis similares producen efectos sobre la autoestimulación de otras áreas del cerebro (Fekete et al., 1983). Todos estos datos sugieren que la colecistoquinina no participa en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial. Es interesante destacar que la colecistoquinina actúa sobre los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> pero no sobre los D<sub>1</sub> (Mashal et al., 1983) y, como se mencionó con anterioridad, los efectos de la dopamina sobre la corteza prefrontal medial parecen estar mediados por los receptores D<sub>1</sub> (Ferrer et al., 1983).

#### 2.3.4. AMINOACIDOS NEUROTRANSMISORES.

Los aminoácidos presuntamente neurotransmisores (fundamentalmente GABA, aspártico y glutámico) también están presentes en la corteza prefrontal (Esclapez et al.,

## INTRODUCCION

1987; Cotman et al., 1987). El Gaba se encuentra en neuronas intrínsecas y el glutámico en neuronas intrínsecas, así como en terminales procedentes de la corteza contralateral y del tálamo (Esclapez, et al., 1987; Cotman et al., 1987). En cuanto a la distribución por capas, se ha demostrado que las neuronas gabérgicas se localizan fundamentalmente en las capas II y VI (Esclapez et al., 1987) mientras que las neuronas glutamérgicas se localizan fundamentalmente en la capa V (Dinopoulos et al., 1989). Precisamente las terminales que contienen dopamina, acetilcolina y sustancia P, así como receptores glutamérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA), poseen una distribución similar concentrándose en las capas profundas de la corteza prefrontal (Berger, et al., 1976; Sakanaka et al., 1983; Cotman et al., 1987; Dinopoulos et al., 1989). Por otra parte, la corteza prefrontal es una de las áreas corticales con mayor densidad de receptores glutamérgicos NMDA (Cotman et al., 1987) y estos receptores han sido implicados en conducta, aprendizaje y memoria (Koek et al., 1986; Morris et al., 1986).

Todos estos datos sugirieron la hipótesis de que los aminoácidos acídicos podrían jugar un papel en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial. Recientemente, Cobo (1990), ha demostrado, mediante estudios neurofarmacológicos y neuroquímicos, que la estimulación eléctrica de la corteza prefrontal medial, a intensidades comprendidas dentro del rango de autoestimulación, produce un descenso significativo de los niveles de ácido glutámico y ha sugerido la participación de los aminoácidos acídicos, particularmente del ácido glutámico y de los receptores glutamérgicos NMDA, en los sustratos neuroquímicos de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata.

### 3. NEUROTENSINA

#### 3.1. GENERALIDADES.

La neurotensina es un tridecapéptido (ver tabla 1, pág. 33) que fué descubierto mientras se estaba trabajando para conseguir aislar otro péptido, la sustancia P, de extractos de hipotálamo bovino. En el transcurso de este proceso, Leeman advirtió la presencia de otra sustancia vasoactiva, distinta de la sustancia P, que producía una marcada vasodilatación en las áreas cutáneas expuestas de ratas anestesiadas, particularmente en las orejas, después de la inyección intravenosa. Su aislamiento, fue dado a conocer en 1973 por Carraway y Leeman y se le llamó *neurotensina* porque fue encontrada en el cerebro y tenía actividad hipotensora. La neurotensina (NT), existe en todos los vertebrados estudiados y también en otros organismos (Nemeroff, 1986). Este neuropéptido se localiza tanto en el sistema nervioso central, como en otros tejidos entre los que cabe destacar: intestino, páncreas, corazón y riñón (Kitabgi et al., 1992). La administración sistémica de NT, produce una gama amplia de acciones que han sido revisadas por Nemeroff y Cain (1985) y Kasckow y Nemeroff (1991). De los efectos producidos tras la administración sistémica de NT caben destacar: vasodilatación e hipotensión, éstasis sanguíneo y hemoconcentración, hiperglicemia e hipoinsulinemia y disminución de la motilidad intestinal y de la secreción ácida del estómago. Igualmente, la administración de NT en el sistema nervioso central produce diversos efectos bioquímicos, electrofisiológicos, conductuales y neuroendocrinos que serán tratados en los dos siguientes apartados de esta Introducción.



En el sistema nervioso central la NT se distribuye de manera heterogénea. En un reciente estudio Kitabgi et al. (1992) han mostrado en la rata la existencia de altas concentraciones de NT en hipotálamo, amígdala, área ventroregmental y globus pallidus, sustancia negra y sustancia gris periacueductal; concentraciones moderadas en septum, hipocampo y accumbens y concentraciones menores en estriado y corteza cerebral. Han sido identificadas diversas vías que contienen NT. Así, se ha descrito una vía que va desde el área ventroregmental hasta el núcleo accumbens (Kalivas y Miller, 1984) y corteza prefrontal (Studler, 1988). Otra vía se dirige desde el núcleo central de la amígdala a la capa nuclear de la estría terminal (Uhl y Snyder, 1977), finalmente encontramos otra que va desde el subiculum hasta el alveus, fimbria, fornix y cuerpos mamilares (Sakamoto et al., 1986).

Existen numerosas evidencias que implican a la NT como neurotransmisor. Se sabe que este neuropéptido es separado de una molécula precursora mayor sintetizada en el citoplasma (figura 3) y que posteriormente la NT se localiza en vesículas sinápticas y se libera tras la despolarización de las neuronas que la contienen (kitabgi et al., 1992; Uhl y Snyder 1977; Bean et al., 1989). Se ha demostrado también la degradación de NT por tres peptidasas: la endopeptidasa 24-11, la endopeptidasa 24.15 y la endopeptidasa 24.16 (Kitabgi et al., 1992) (ver figura 4).

Mediante la utilización de ligandos iodados o tritiados de NT en preparaciones de membrana de cerebro de ratón, se ha descrito la existencia de dos subtipos de receptores para la NT, uno de alta afinidad ( $K_d = 0.13 \text{ nM}$ ) y otro de baja afinidad ( $K_d = 2.4 \text{ nM}$ ) (Mazella et al., 1983; Vicent, 1992). En un estudio sobre estos receptores en fracciones subcelulares, Schotte et al. (1983) demostraron que los receptores de alta afinidad están asociados con neuronas, mientras que los receptores de baja afinidad están asociados con células gliales. Aún cuando 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). Estudios recientes indican que el receptor de alta afinidad en tejido cerebral de ratón y rata recién nacida, corresponde a una proteína de 100 kDa y en rata adulta de 50 kDa (Vicent, 1992). Los acontecimientos bioquímicos que median la señal de transducción para los receptores de NT, han empezado a ser caracterizados. Así, la unión de NT a su receptor, estudiada en células del clon N1E115 del neuroblastoma de ratón producen tres efectos principalmente: aumento de la concentración de GMPc, disminución de AMPc y aumento de inositoltrifosfato. (Vicent, 1992). La capacidad de interacción de la NT con sus receptores radica en la pareja de aminoácidos "-His<sub>12</sub>-Leu<sub>13</sub>" del extremo aminoterminal de la molécula del neuropéptido (ver tabla 1, pág 31), (Checler et al., 1986). En casi todas las regiones que contienen NT hay una distribución paralela de receptores de NT (Emson et al; 1985). La más alta densidad de receptores de NT se encuentra en la zona compacta de la sustancia negra y en el área ventroregmental, así como en las terminales dopaminérgicas de los tubérculos olfatorios y de la corteza frontal (Young y Kuhar, 1981).

INTRODUCCION

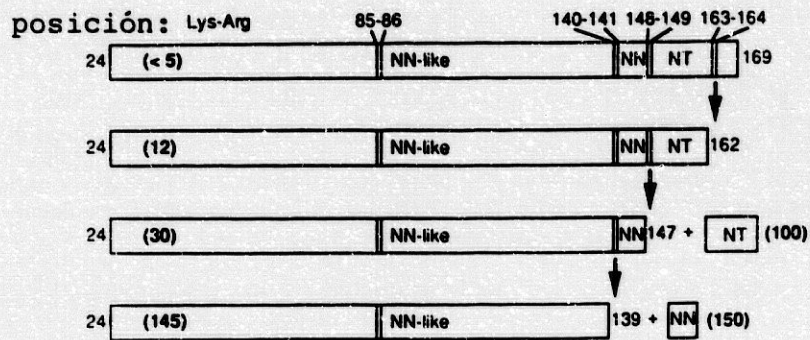


FIGURA 3. Representación esquemática de los sitios de hidrólisis y productos elaborados a partir del precursor de NT/neuromedina N. Las flechas indican los dobletes Lys-Arg en donde se produce el procesamiento. (Modificado de Kitabgi et al., 1992)

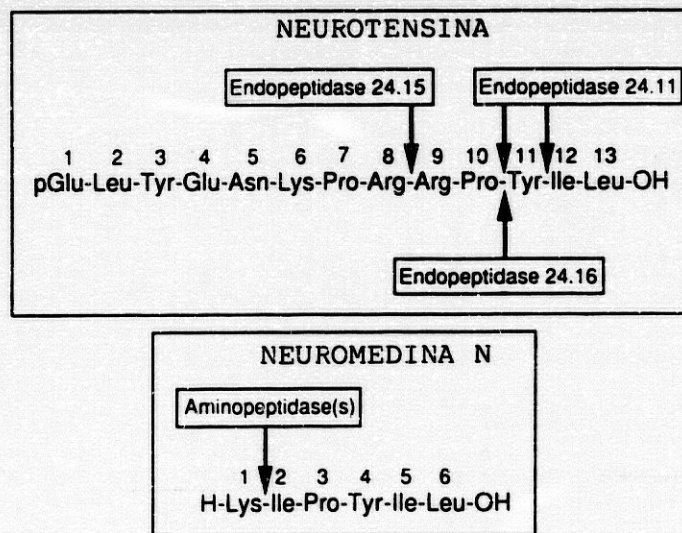


FIGURA 4. Mecanismos de la inactivación por peptidasas de NT y neuromedina N. Las flechas indican aquellos enlaces peptídicos que rompen las peptidasas (Modificado de Kitabgi et al., 1992).



### 3.2. FUNCIONES DE LA NEUROTENSINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La NT ha sido implicada en diversos aspectos funcionales del sistema nervioso central. Así, se ha demostrado su participación en los mecanismos de antinocicepción, termorregulación, control del tono muscular, regulación neuroendocrina y una variada gama de procesos conductuales incluida la autoestimulación cerebral, como ya se ha comentado previamente. En este sentido, se ha descrito que la administración central de NT produce inhibición de la respuesta de evitación, hipotermia, catalepsia, disminución del tono muscular y de la actividad motora (Nemeroff y Cain, 1985; Jolicoer y Menard, 1992). En relación con la regulación neuroendocrina, se ha demostrado que la NT produce un aumento en los niveles plasmáticos de diversas hormonas como ACTH, corticosterona, gonadotrofinas, hormona del crecimiento y prolactina (Rowe et al., 1992).

En relación con los procesos conductuales, los estudios relativos a la acción de la NT sobre la actividad motora han mostrado la existencia de una íntima relación entre NT y dopamina en el sistema nervioso central (aspecto que será tratado más detalladamente en el siguiente apartado de esta Introducción). Así, se ha descrito que los efectos de la administración intracerebral de NT sobre la actividad motora dependen de que la NT haya sido aplicada en las áreas terminales dopaminérgicas o en el origen de las mismas. En este sentido, si la NT se aplica sobre el citoplasma de neuronas dopaminérgicas en el área ventrotectal, las ratas exhiben un aumento en las conductas de exploración, incluyendo locomoción y olfateo (Nemeroff et al., 1977). Esto se acompaña por un aumento en la utilización de dopamina en el núcleo accumbens (Kalivas et al., 1982). Por el contrario, la inyección intracerebroventricular o la microinyección en el núcleo accumbens de NT produce una disminución dosis-dependiente en la actividad motora inducida por la D-anfetamina (Ervin et al., 1981).

Uno de los aspectos funcionales más atractivos de la NT, por su posible proyección terapéutica, radica en el hecho de que comparte con los fármacos antipsicóticos muchas de sus propiedades bioquímicas y conductuales. Así, ambos producen aumento en el *turnover* de dopamina en el núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y en menor extensión en el caudado. Ambos potencian la sedación inducida por etanol y barbitúricos y ambos producen hipotermia. Igualmente, disminuyen la actividad locomotora, producen catalepsia y relajación muscular e inhiben la conducta de evitación pero no la respuesta de escape (Snidgers et al., 1982; Luttinger et al., 1982). Como se indicó más arriba, la NT, como las drogas antipsicóticas, bloquea la hiperactividad producida por la D-anfetamina y otros psicoestimulantes. Estas características han llevado a definir a la NT como un *neuroléptico endógeno*.

La NT difiere, sin embargo, de las drogas antipsicóticas en varios aspectos. Así, la NT no se une directamente a los receptores dopaminérgicos, ni bloquea la estereotipia inducida por la D-anfetamina. En este sentido, la NT recuerda más al antipsicótico atípico clozapina, que tampoco bloquea la estereotipia inducida por la D-anfetamina (Tamminga y Gerlach, 1987). Además, la NT intracerebral es un potente agente antinociceptivo, mientras que los neurolépticos no lo son.

Existe un conjunto de interesantes estudios que demuestran que tanto el tratamiento crónico, como agudo con drogas antipsicóticas en ratas de laboratorio produce elevaciones marcadas en las concentraciones de NT en el núcleo accumbens y en el

## INTRODUCCION

núcleo caudado (Govoni et al., 1980; Bissette et al., 1988; Radke et al., 1989). Estos efectos se han observado con haloperidol, clorpromacina, trifluoperacina y pimozide, pero no con fenotiacinas clínicamente inefectivas tales como promacina o prometacina (Govoni et al., 1980). Estos tratamientos con neurolépticos producen también un aumento del RNAm de la molécula precursora de NT en los núcleos caudado y accumbens (Merchant et al., 1991). Lo que sugiere que el aumento de los niveles de NT provocados por los neurolépticos en estas estructuras es debido a un aumento de la síntesis de NT.

Existe una muy amplia literatura relativa a los efectos electrofisiológicos de la NT en diversas estructuras del sistema nervioso central y que ha sido revisada recientemente por Shi y Bunney (1992). Estos estudios revelan que, en general, predomina el efecto excitatorio de la misma. Así, se ha descrito excitación en corteza prefrontal y somatosensorial, núcleo de la stria terminalis, núcleo del tracto solitario, sustancia gris periacueductal y motoneuronas espinales. Excitación y/o inhibición en hipotálamo, neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y células de Purkinje del cerebelo y sólo inhibición en locus ceruleus.

### 3.3. INTERACCION NEUROTENSINA-DOPAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La NT interactúa con los sistemas neuronales dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos y noradrenérgicos (Kasckow y Nemeroff, 1991). De estas interacciones son especialmente relevantes las que se establecen con los sistemas dopaminérgicos centrales, tanto por el enorme acúmulo de evidencias experimentales existentes, como por la posible participación de la NT en la fisiopatología de diversos trastornos mentales en los que la dopamina ha sido implicada, como es el caso de la enfermedad de Parkinson y especialmente la esquizofrenia (Stowe, et al., 1991).

Desde la demostración por Nemeroff et al. (1980) de que los efectos hipotérmicos de la NT se incrementan tras la lesión selectiva de la neuronas catecolaminérgicas con 6-hidroxi-dopamina, se han ido acumulando evidencias anatómicas, bioquímicas, electrofisiológicas y conductuales sobre la existencia de interacciones fisiológicas entre NT y dopamina en el sistema nervioso central del mamífero (Kasckow y Nemeroff, 1991). Los estudios iniciales sobre la distribución de NT en el cerebro de rata mostraron la presencia de altas concentraciones de este péptido en las áreas que contienen los cuerpos celulares que dan origen a los sistemas dopaminérgicos nigroestriatal y mesolímbico (Carraway y Leeman, 1976; Uhl y Snyder, 1977). La mayoría de los estudios posteriores dedicados al estudio de la interacción entre NT y dopamina se han focalizado, precisamente, en estos dos sistemas dopaminérgicos.

Así, estudios inmunohistoquímicos han revelado la presencia de densos plexos de terminales neurotensinérgicas en la sustancia negra y área ventrotectal, así como en sus áreas terminales como son los núcleos caudado-putamen y accumbens respectivamente (Beaudet y Woulfe, 1992). Además, una pequeña proporción de las neuronas dopaminérgicas del área ventrotectal contienen también NT y colecistoquinina (Hökfelt et al., 1984). Estas neuronas que presentan colocalización de dopamina y NT son el origen de la vía mesocortical dopaminérgica, que será tratada en detalle en un capítulo posterior. Por otra parte los estudios con autorradiografía y de lesión con 6-hidroxi-dopamina, han mostrado la existencia de sitios de unión de alta afinidad para



la NT tanto en los cuerpos celulares como en las terminales de los sistemas nigroestriatal y mesolímbico (Dilts y Kalivas, 1989; Hervé et al., 1986; Palacios y Kuhar, 1981). Estudios farmacológicos, como de hibridación *in situ*, han confirmado que virtualmente todos los sitios de unión de alta afinidad de la NT se corresponden con receptores funcionalmente relevantes para dicho neuropéptido (Kitabgi et al., 1985; Elde et al., 1990).

La actividad de los receptores de NT parece ser la responsable de los efectos de este neuropéptido sobre la actividad de las células dopaminérgicas nigroestriatales y mesolímbicas. Estos efectos incluyen:

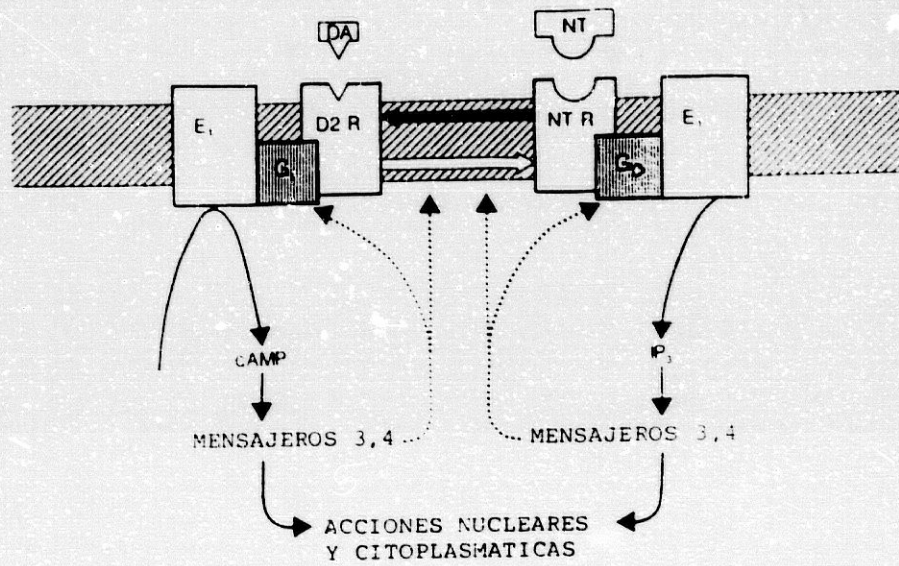
1) Incremento en la actividad eléctrica de las células dopaminérgicas registradas tras la aplicación local de NT, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la sustancia negra o el área ventrotectal (Andrade y Aghajanian, 1981; Seutin et al., 1989).

2) Incremento en el metabolismo dopaminérgico y/o liberación de dopamina medida localmente en el neostriado y núcleo accumbens tras la microinyección de NT en la sustancia negra o en el área ventrotectal (Myer y Lee, 1983; Ford y Marsden, 1990).

3) Modulación por la NT de la actividad de los agonistas dopaminérgicos  $D_2$  sobre la liberación de dopamina en el estriado.

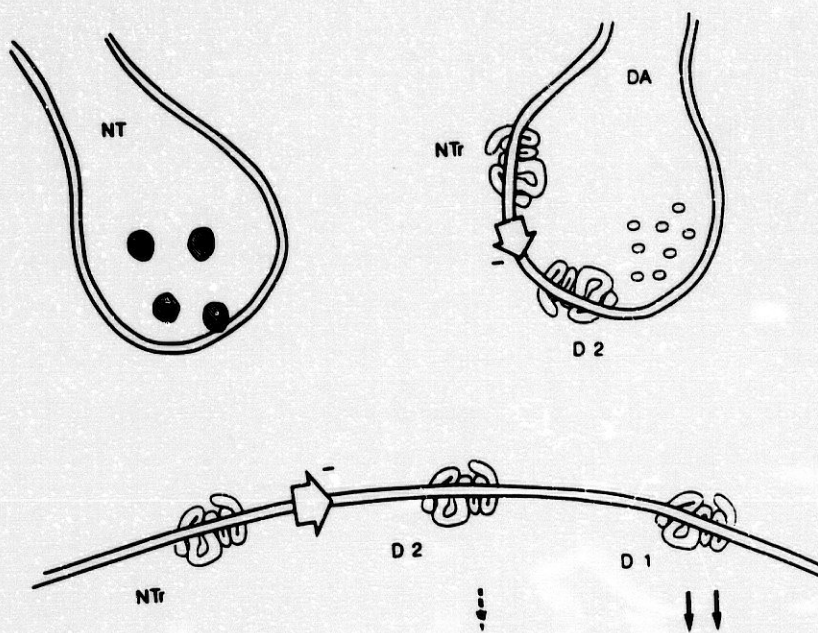
En relación con este último punto, recientes estudios han dado luz acerca de los mecanismos íntimos de la interacción de NT y dopamina en el cerebro. En 1989, Tanganelli et al., demostraron que a dosis nanomolar (10 nmol) la NT, administrada en dicha estructura no produce ningún efecto sobre la liberación basal de dopamina en el estriado, en cambio antagoniza la inhibición de la liberación de dopamina inducida por la apomorfina. Estudios posteriores han demostrado que son los receptores  $D_2$  los implicados, ya que estos efectos se han replicado con agonistas selectivos  $D_2$  y no con los  $D_1$  (Fuxe et al., 1992). Estos autores han sugerido que dichos resultados pueden deberse al hecho de que, a concentraciones nanomolares, la NT reduce los efectos funcionales de la estimulación presináptica de los receptores  $D_2$  mediante la existencia de una interacción intramembrana entre los receptores de NT y dopamina. Dicha interacción parece implicar cambios alostéricos entre regiones adyacentes transmembrana en donde se sitúan los receptores y posiblemente también la activación por la NT de kinasas y fosfatasa ligadas a la membrana que conducirían a la fosforilación de determinados residuos de aminoácidos de la porción citosólica de la cadena polipeptídica del receptor  $D_2$  (ver Fig. 5 y 6). Fuxe et al., (1992) han sugerido que los efectos neurolépticos de la NT pueden deberse, al menos en parte, a esta modulación de la actividad de los receptores  $D_2$  por dicho neuropéptido.

INTRODUCCION



**FIGURA 5.** Representación esquemática de las interacciones intramembrana entre las regiones transmembrana de los receptores de NT y D<sub>2</sub>. El posible papel de segundos mensajeros citosólicos está representado, aún cuando su participación aún no ha sido confirmada. cAMP: adenosin trifosfato cíclico. DA: dopamina. E: efector. G: proteína G. IP<sub>3</sub>: inositoltrifosfato. NT: neurotensina. R: receptor. La flecha negra indica la regulación inhibitoria intramembrana del receptor D<sub>2</sub> sobre el de NT y la flecha en blanco la activación *feedback* del receptor de NT por el D<sub>2</sub>. Las flechas de trazo discontinuo representa el arco *feedback* sobre los mecanismos de transducción y decodificación de membrana. (Modificado de Fuxe et al., 1992).





**FIGURA 6.** Representación esquemática de las posibles interacciones intramembrana pre y postsinápticas entre los receptores de neurotensina (NTr) y los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> en las neuronas espinosas de mediano tamaño del estriado. La activación de los receptores de NT produce una reducción de la afinidad de los receptores D<sub>2</sub> para sus agonistas y aumenta la afinidad de los agonistas D<sub>1</sub>. La flecha discontinua representa la reducción de la transmisión mediada por los receptores D<sub>2</sub>. Las dos flechas continuas representan el incremento de la actividad debida a los receptores D<sub>1</sub> (Modificado de Fuxe et al., 1992).

Recientemente Adachi et al., (1990) han propuesto un nuevo mecanismo relacionado con la interacción entre NT y dopamina en el sistema nervioso central. Estos autores han descrito que la NT presenta la capacidad de formar complejos extracelulares con la dopamina, de manera que disminuye la capacidad de la dopamina para unirse a sus receptores y por lo tanto impide la neurotransmisión dopaminérgica. Esta propiedad de la NT parece ser la responsable del antagonismo por dicho neuropéptido de la hiperactividad motora producida por la amfetamina y otros psicoestimulantes (Ervin et al., 1981; Nemeroff et al., 1983; Joliceur et al., 1985). Estudios voltamétricos y de espectroscopía han demostrado que el grupo "-Arg<sub>6</sub>-Arg<sub>7</sub>-" de la secuencia de la NT es fundamental para la unión con la dopamina (ver tabla 1) (Adachi et al., 1990).

INTRODUCCION

Péptido	Secuencia	Q	R
NT	pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	+	+
NT(1-11)	pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr	+	-
Neuromedina N	Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu	-	+
Xenopsina	pGlu-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu	+	+

**TABLA 1.** Secuencia aminoacídica de la NT y de sus análogos utilizados en esta Tesis. Los grupos "-Arg<sub>6</sub>-Arg<sub>6</sub>" y "-Ile<sub>2</sub>-Leu<sub>13</sub>" responsables de la actividad quelante de la NT sobre la dopamina, y de la unión de la NT a sus receptores respectivamente, han sido marcados en negrita. En la columna de la derecha se indica con el símbolo (+) la capacidad de estos neuropéptidos de quelar la dopamina (Q) y/o de activar a los receptores de NT (R).

Los estudios anteriormente citados han sido realizados en la rata. Hay que hacer notar que, parte de los resultados obtenidos en dicho animal han sido confirmados en primates y en el hombre, aún cuando existen importantes diferencias. En este sentido se ha confirmado que las células dopaminérgicas nigrales y ventrotegumentales presentan receptores para la NT y están densamente innervadas por terminales neurotensinérgicas tanto en primates como en el hombre (Mai et al., 1987; Deutch y Zahn, 1992). En cambio parece claro que en primates y en el hombre no existe colocalización de dopamina y NT en las células ventrotegumentales que proyectan a la corteza prefrontal (Gaspar et al., 1990; Deutch y Zahn, 1992). Estos resultados demuestran la existencia de importantes diferencias entre especies.

Las evidencias anteriormente comentadas demuestran la existencia de una clara regulación de los sistemas dopaminérgicos por la NT, el caso contrario también ha sido demostrado. Así, la interrupción de la transmisión dopaminérgica de dopamina tanto por la aplicación de antagonistas dopaminérgicos, especialmente D<sub>2</sub>, como por lesiones con 6-hidroxidopamina en sustancia negra y área ventrotegumental producen un aumento de los niveles de NT en el neocórtex y núcleo accumbens (Deutch y Zahn, 1992). Este aumento de la NT en el estriado parece ser debido tanto a un aumento de la síntesis como a una disminución de la liberación del neuropéptido (Deutch y Zahn, 1992).

Los datos anteriormente expuestos muestran claramente la existencia de una íntima interacción funcional entre NT y dopamina en el sistema nervioso central del



mamífero y sugieren fuertemente que gran parte de las funciones centrales de la NT pueden estar mediadas por los sistemas dopaminérgicos.

#### 3.4. NEUROTENSINA Y CORTEZA PREFRONTAL.

En 1982, Quirion et al., describieron la existencia de una alta densidad de receptores para la NT en la corteza prefrontal de la rata. La distribución de estos receptores corresponde estrictamente con la inervación dopaminérgica prefrontal descrita por Lindvall y Björklund (1984), observándose una mayor densidad de receptores de NT en las capas profundas V y VI. Posteriormente Studler et al., (1988) demostraron que prácticamente la totalidad de las terminales dopaminérgicas prefrontales, pertenecientes a la vía mesocortical, contienen también NT (ver figura 7). Aún cuando hay dopamina y NT en un *pool* sensible a la reserpina en la corteza prefrontal, la mayoría de la dopamina y de la NT presente en este área parecen estar almacenadas en *poos* separados (Bean et al., 1989). La proporción de terminales dopaminérgicas prefrontales que contienen también NT varía notablemente entre especies. Así en las ratas de raza Sprague-Dawley el porcentaje es prácticamente el 100%, mientras que en las de raza Wistar sólo se ha podido demostrar en un 40% de dichas terminales (Studler et al., 1988; Febvret et al., 1991). Por el contrario no se ha encontrado colocalización en las terminales dopaminérgicas del primate y del hombre (Gaspar et al., 1990; Deutch y Zahn, 1992).

A diferencia de los sistemas nigroestriatal y mesolímbico, la lesión con 6-hidroxidopamina del área ventrotégmental no sólo no disminuye el número de receptores de NT en la corteza prefrontal, sino que por el contrario éstos aumentan (Dilts y Kalivas, 1989; Quirion et al., 1985; Tassin et al., 1988). Estos resultados demuestran que en la corteza prefrontal los receptores de NT se localizan predominantemente en la membrana de las neuronas prefrontales no dopaminérgicas y no en las terminales dopaminérgicas. Esta localización predominantemente postsináptica de los receptores de NT coincide con la observada para los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> en dicha área cortical. Además se ha demostrado que ambos tipos de receptores presentan una distribución similar en la corteza prefrontal (ver figura 7), (Tassin et al., 1992).

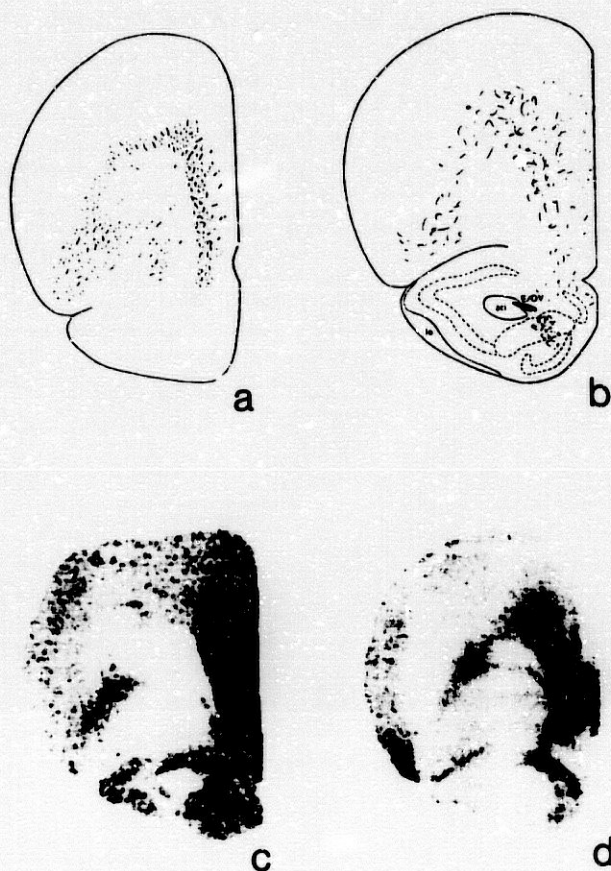
Diversos estudios han mostrado que la liberación de moléculas colocalizadas en una misma neurona puede verse afectada tanto por la frecuencia como por el patrón de estimulación axonal, de manera que a bajas frecuencias solamente el neurotransmisor no peptídico es liberado, mientras que a altas frecuencias o durante ráfagas (*bursts*) de potenciales de acción el neurotransmisor peptídico es coliberado (Lundberg et al., 1989; Bloom et al., 1987; Bartfai et al., 1988). Similares resultados se han obtenido recientemente en relación en el sistema mesocortical. Así, Bean y Roth (1992) han mostrado que estimulaciones a baja frecuencia (2.5 Hz) del fascículo prosencefálico medial produce la liberación *in vivo* sólo de dopamina en la corteza prefrontal medial, mientras que a frecuencias mayores (10-20 Hz) o durante la estimulación a ráfagas, tanto la dopamina como la NT son liberadas. El cociente de liberación dopamina/NT, en este área cortical, desciende exponencialmente con el incremento de la frecuencia de estimulación. Estos autores han demostrado también que la liberación diferencial de NT y dopamina en la corteza prefrontal medial de la rata puede verse afectada por la actividad de los autorreceptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>. Así la estimulación de estos autorreceptores con diversos agonistas dopaminérgicos produce una inhibición de la liberación basal de

## INTRODUCCION

dopamina y un incremento de la de NT. Por el contrario el bloqueo de los mismos receptores por el sulpiride produce un incremento de la liberación estimulada de dopamina y un descenso de la de NT. Estos resultados demuestran que la liberación de dopamina y NT coexistentes en las terminales meso-cortico-prefrontales de la rata está influenciada por factores tanto electrofisiológicos como farmacológicos de tal modo que, bajo ciertas condiciones, la liberación predominante de uno de los neurotransmisores puede verse favorecida.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los receptores de NT presentes en la corteza prefrontal se hallan situados en la membrana de las células prefrontales sobre las que las terminales mesocorticales establecen sinapsis. Recientemente, Audinat et al., (1989) han descrito los efectos de la NT sobre la actividad eléctrica de estas neuronas. Estos autores han mostrado que la aplicación de neurotensina en rodajas de corteza prefrontal de rata produce despolarización en el 88% de las neuronas estudiadas. Este efecto parece ser directo sobre las células registradas y mediado por los receptores de NT. Además de este efecto excitatorio, los autores también observaron un incremento tanto en potenciales postsinápticos excitadores como inhibidores, lo que indica que la NT puede actuar sobre neuronas excitadoras e inhibidoras en la misma preparación. Curiosamente, los efectos de la NT son muy similares a los descritos para la dopamina en la misma población neuronal por el mismo grupo de autores (Penit-Soria et al., 1987). El hecho de que la aplicación de antagonistas dopaminérgicos no bloqueen los efectos de la NT sugiere que los efectos electrofisiológicos de la NT no son debidos a una liberación de dopamina inducida por este neuropéptido en las terminales mesocorticales. Es intrigante el hecho de que la NT, que presenta propiedades bioquímicas y conductuales similares a los neurolépticos, produzca efectos similares a los de la dopamina en la corteza prefrontal.





**FIGURA 7.** Comparación de las distribuciones topográficas de las terminales nerviosas dopaminérgicas, neurotensinérgicas, receptores de NT y receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> en la corteza cerebral anterior en la rata. a: Distribución de las terminales nerviosas de dopamina. b: Distribución de las terminales nerviosas de NT. c: Distribución de los receptores D<sub>1</sub>. d: Distribución de los receptores de NT. (Tomado de Tassin et al., 1992).

### 3.5. NEUROTENSINA Y AUTOESTIMULACION.

A diferencia de otros neurotransmisores, existen pocos datos relativos al papel de la NT en el inicio y mantenimiento de conductas motivadas. Estudios iniciales han demostrado que la administración de NT en el área ventro tegmental del mesencéfalo tiene propiedades recompensantes, medidas con paradigmas tales como el modelo de lugar preferente condicionado o modelos de autoadministración (Glimcher et al., 1984; Glimcher et al., 1987). En relación con el proceso de autoestimulación, recientemente se han

## INTRODUCCION

publicado algunos estudios. Así, Rompré et al., (1992), han mostrado que inyecciones de NT en el área ventrotegmental facilitan el proceso de autoestimulación de la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo. Puesto que la NT aplicada en el área ventrotegmental produce una activación de las neuronas dopaminérgicas de esta área, así como la liberación de dopamina en las regiones terminales dopaminérgicas, estos autores han sugerido que la facilitación de la autoestimulación obtenida tras la inyección de NT en el área ventrotegmental puede deberse a su papel modulador sobre las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Por su parte, Witte et al. (1992) han mostrado que la administración intraventricular de pequeñas dosis de NT (30 pmol) produce una inhibición de la autoestimulación en el fascículo prosencefálico medial. Mientras que dosis mayores (150 pmol - 20 nmol) y administradas en núcleo accumbens, subiculum o área ventrotegmental producen un aumento de la autoestimulación en el fascículo prosencefálico medial.

A pesar de estos primeros estudios que indican una participación de la NT en conductas motivadas por refuerzos positivos, es necesaria la realización de más estudios para dilucidar el papel de la NT en los mecanismos centrales de recompensa, en general, así como en el proceso de autoestimulación cerebral en particular. Precisamente éste es el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral.



**OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

### OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.

Como ha sido comentado en apartados anteriores, la dopamina, la sustancia P y la acetilcolina forman parte del sustrato neuroquímico que subyace al proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata (Mora y Ferrer, 1986). La distribución de NT en este área cerebral mimetiza la de estos neurotransmisores. Especialmente íntima es la relación existente entre NT y dopamina, ya que no sólo ambos neurotransmisores se encuentran localizados en las mismas terminales, sino que también existen datos que demuestran una relación funcional entre ambos en la corteza prefrontal (Studler et al., 1988; Bean y Roth, 1992).

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido estudiar si la NT participa o no en el proceso de autoestimulación de la corteza prefrontal medial en la rata.

Para ello se han investigado los efectos de la administración intracerebral de NT así como la de sus análogos xenopsina, neuromedina N y NT 1-11 sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial.

Los análogos de la NT utilizados han sido elegidos por sus diferentes propiedades relativas tanto a su capacidad de interactuar con los receptores de NT, como la de formar complejos extracelulares con la dopamina. Como se ha mostrado en la tabla 1, pág. 31, tanto la NT como la xenopsina son capaces tanto de unirse a los receptores de NT como de formar complejos extracelulares con la dopamina. En cambio, la neuromedina N sólo es capaz de unirse a los receptores de NT y la NT 1-11 sólo de formar complejos extracelulares con la dopamina. Las características opuestas de la neuromedina N y la NT 1-11 nos ha permitido investigar el papel que el mecanismo de formación de complejos extracelulares de NT y dopamina puede jugar en los efectos de la NT sobre la autoestimulación.



RAIMUNDO SABATER

**MATERIAL Y METODOS**



### 1. ANIMALES.

Los animales utilizados han sido ratas adultas machos de un peso comprendido entre 250 y 300 grs. de la raza Wistar, suministradas por el Estabulario de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Los animales se mantuvieron aislados en jaulas individuales con un fotoperiodo de 12 horas y una temperatura de 20 - 25° C. La comida y bebida fue administrada *ad libitum*.

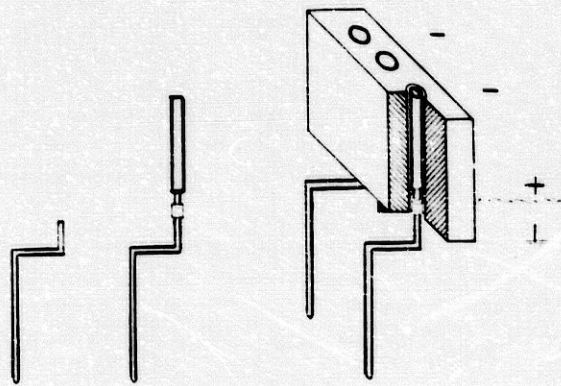
### 2. PREPARACION DE IMPLANTES CEREBRALES DE CANULAS Y ELECTRODOS.

En todos los experimentos realizados, se utilizaron implantes compuestos por dos electrodos monopolares para estimulación cerebral y dos cánulas guía para la administración intracerebral de los neuropéptidos estudiados.

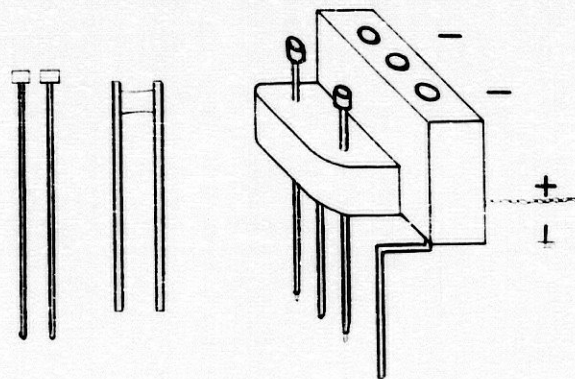
El procedimiento de construcción de estos implantes es el siguiente:

Los electrodos se obtienen de dos alfileres entomológicos de acero inoxidable de 0.25 mm de diámetro. Una vez doblados dos veces en ángulo recto, los electrodos se introducen y se unen por presión en sendos conectores hembra (Amphenol 220-S02). Un tercer conector se une mediante estaño a un cable fino de acero inoxidable y es utilizado como polo de referencia (tierra). Los tres conectores se introducen en un armazón de polivinilo aislante (Amphenol). Los electrodos, de 5mm de longitud, se disponen con una separación de 1.6 mm. Reguladas estas medidas, se aseguran mediante una gota de pegamento (Araldit) en la base del armazón de polivinilo aislante. Seguidamente, los electrodos se aíslan con barniz tixotrópico a excepción de 0.3-0.5 mm en la punta.

A cada electrodo se le añade mediante cemento dental una cánula guía de acero inoxidable de 23 ga de diámetro externo y 10 mm de longitud. La cánula se sitúa paralela al electrodo a una distancia de 1 mm anterior y 2.5 mm por encima de la punta del electrodo. Las figuras 8 y 9, muestran un ejemplo del implante anteriormente descrito.



**FIGURA 8.** Preparación de electrodos. A: Electrodo. B: Electrodo unido al conector. C: Conectores y electrodos en su soporte aislante. Los electrodos van unidos a los soportes de los extremos. El conector central se suelda a un cable flexible que va conectado al polo positivo y a tierra. La sección muestra la situación del conector en el armazón de polivinilo aislante.



**FIGURA 9.** Implante de electrodo y cánula. D: Fiadores. E: Cánulas. F: Las cánulas se han adosado mediante cemento plástico dental a un implante con electrodos idéntico al anterior.

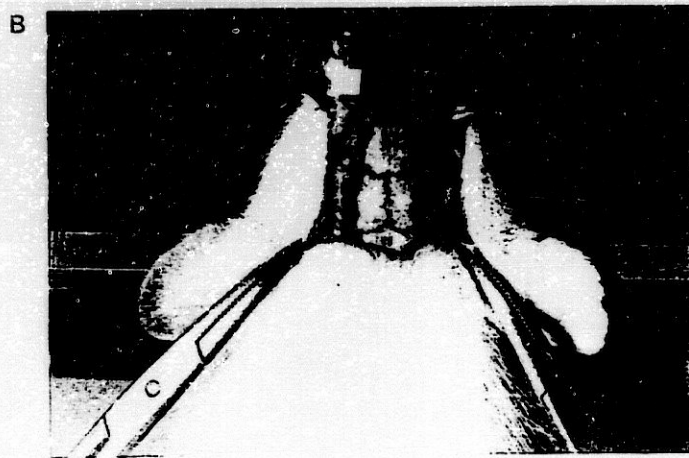
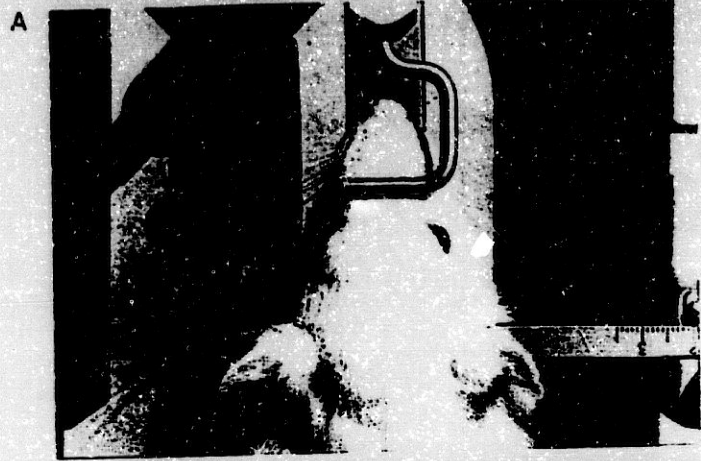


### 3. PROCEDIMIENTO QUIRURGICO: ESTEREOTAXIA.

Una vez anestesiados los animales con equitensin (2 ml/kg i.p.)(Ferrer, 1984) se colocan en un estereotáxico para roedores David Kopf 900. Tras exponer la calota, se toman las coordenadas estereotáxicas anteroposterior y mediolateral de la corteza prefrontal medial, utilizando bregma como referencia, y se señalan sobre la calota. Seguidamente, y tras realizar pequeñas craneotomías se introducen tres tornillos en zonas que no interfieran con el implante. A continuación, se realiza una craneotomía en las marcas estereotáxicas de la corteza prefrontal medial. Una vez expuesta la duramadre, se realiza una pequeña incisión hasta dejar visible la superficie cerebral. Realizado esto, se toman de nuevo las coordenadas estereotáxicas de la corteza prefrontal medial (3.0 mm anterior a bregma; 0.8 mm anterior a la línea media y 2.8 mm por debajo de la superficie cerebral) y se introducen cánulas y electrodos en la corteza prefrontal medial. El cable del conector central del implante, que se utiliza como tierra, se fija a los tres tornillos. Seguidamente, se fija el implante a la calota con resina plástica (Perfex), englobando también a los tres tornillos. Fraguada la resina el animal es retirado del estereotáxico. Para evitar obturaciones, en cada cánula guía se introduce un fiador de acero inoxidable de 31 ga de diámetro y 9.8 mm de longitud. Algunas de las fases del procedimiento quirúrgico se ilustran en la figura 10. Finalizada la intervención quirúrgica el animal es devuelto a su jaula.

**FIGURA 10.** Las fotografías A, B y C (página siguiente), muestran tres momentos de la intervención quirúrgica. En la primera de ellas, se puede observar la fijación de la rata en el estereotáxico mediante dos barras auriculares y la sujeción del maxilar superior. La segunda fotografía muestra el punto bregma, usado como referencia en las coordenadas estereotáxicas, y la localización de los electrodos sobre la calota. La fotografía 3, muestra en una visión lateral un implante de electrodos y cánulas.





#### 4. METODOS EXPERIMENTALES:

##### 4.1. ESTIMULACION ELECTRICA CEREBRAL.

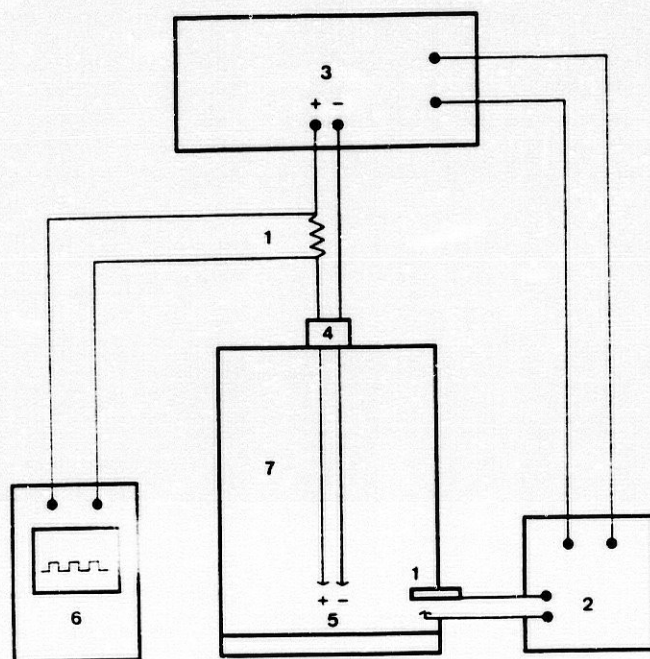
El material utilizado en el proceso de estimulación eléctrica cerebral es el siguiente:

- Cajas de experimentación. Letica 26 x 29 x 36 cm. LI 830 (2).
- Contador eléctrico (4).
- Estimulador. Cibertec, CS - 220 A (2).
- Módulo digital. Letica LI 12000.
- Osciloscopio. Beckman 9020

La estimulación eléctrica del cerebro consistió en un tren de ondas cuadradas monofásicas negativas a una frecuencia de 100 hz, generado por un estimulador eléctrico. La intensidad del estímulo es constante para cada rata, pero variable de un animal a otro. Para conocer la intensidad aplicada se utilizó la ley de Ohm  $I = V/R$ . El potencial eléctrico V, se conoció por medio del osciloscopio, y la impedancia R fue la de una resistencia conectada en serie con el circuito. En los experimentos realizados, las intensidades se hallaron entre 200 y 600  $\mu A$ .

Esquemáticamente, este circuito funciona de la siguiente manera: cuando la rata aprieta la palanca de la jaula de experimentación, se cierra el circuito del temporizador adosado al módulo digital; éste da una señal de 0.3 seg de duración al estimulador, el cual origina una corriente pulsante regulable que es observada por el osciloscopio adosado al sistema. La conexión del cable bipolar, que conduce el impulso eléctrico al implante de la rata, se realiza de la siguiente forma: el polo positivo se une al conector central que va unido a tierra a través de los tornillos de fijación, el otro polo puede ir colocado sobre el conector derecho o izquierdo, respectivamente. Un ejemplo del sistema de autoestimulación puede verse en la figura 11.





**FIGURA 11.** Representación del circuito de estimulación eléctrica: 1: Palanca de autoestimulación que cierra el circuito del temporizador. 2: Módulo digital y temporizador que envía la señal de duración determinada al estimulador. 3: Estimulador que origina un tren de pulsos cuadrados de características regulables. 4: Distribuidor de mercurio. 5: Conexiones (tierra y electrodo estimulante). 6: Osciloscopio. 7: Caja de experimentación.

#### 4.2. OBTENCION DE AUTOESTIMULACION CEREBRAL.

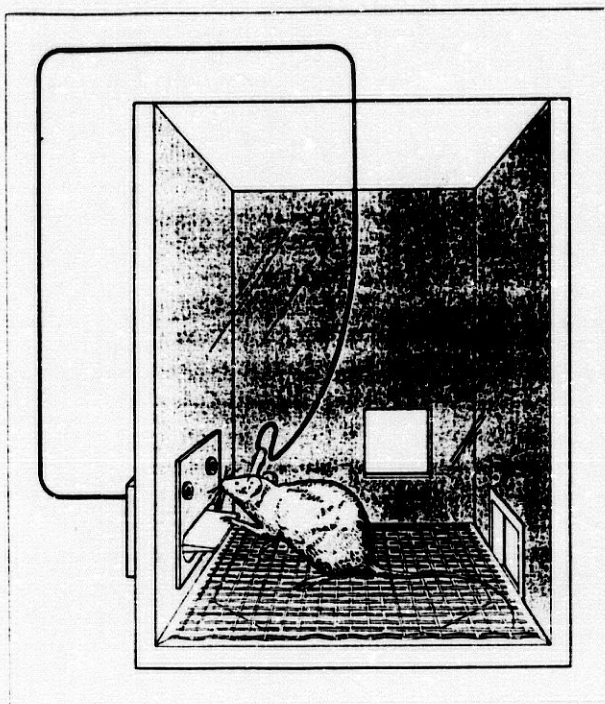
Una semana después de la intervención quirúrgica y tras la completa recuperación del animal, éste se introdujo en la caja de experimentación por primera vez y se conectaron los cables al implante, como ha sido indicado anteriormente. Realizado esto, el experimentador cierra el circuito cada vez que el animal se aproxima a la palanca. El periodo de aprendizaje comprendió sesiones de una mañana y tarde de 30 min. de duración, realizados diariamente. Estas sesiones se repitieron hasta que el animal apretó espontáneamente la palanca para obtener estimulación de su cerebro (figura 12).

Una vez obtenida una conducta persistente y reproducible de autoestimulación, se realizó una curva de intensidad-respuesta. Esta consiste en determinar la variación de la tasa (frecuencia) de autoestimulación, en función de la intensidad del estímulo. Se utiliza un rango de intensidades comprendido entre 100 y 600  $\mu\text{A}$ . En cada intensidad se mide la tasa de autoestimulación durante dos minutos. En primer lugar, las intensidades se presentan en sentido creciente, de 100 a 600  $\mu\text{A}$ , y tras 20 minutos se repite el proceso en sentido inverso.

Con este procedimiento, se determina la intensidad umbral, la intensidad que presenta la tasa más alta, así como la intensidad en la cual el animal muestra reacciones motoras. La intensidad elegida para los experimentos es aquella que está por encima del umbral, que no origina la mayor tasa de respuesta y que permite una reproductibilidad de la autoestimulación sin producir efectos motores o crisis convulsivas. Un ejemplo de curva intensidad-respuesta se muestra en la figura 13.

Elegida la intensidad idónea para cada rata, se inició un periodo de estabilización de la tasa de autoestimulación que suele durar de 7 a 10 días. Cuando la autoestimulación estuvo estabilizada (variaciones de la tasa de autoestimulación inferiores al 10%), se iniciaron los experimentos. Un ejemplo de estabilización de la tasa de autoestimulación se muestra en la figura 14.





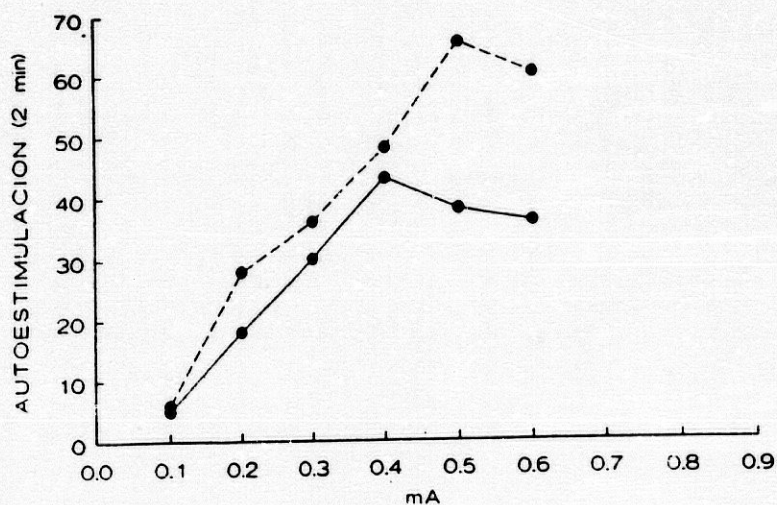
**FIGURA 12.** Dibujo que representa a una rata autoestimulándose en su jaula de experimentación.

#### **4.3. MICROINYECCION INTRACEREBRAL.**

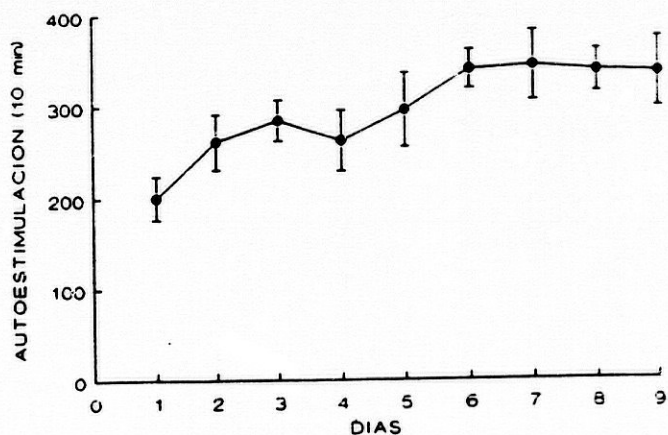
El sistema de microinyección intracerebral se compone de una cánula inyectora de acero inoxidable de 31 ga de diámetro y 11.5 mm de longitud, conectada por medio de un tubo de polietileno PE-10 a una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l, la cual va colocada en una bomba de infusión Harvard 940-A, (ver figura 15).

El procedimiento de microinyección es el siguiente: se retira el fiador de la cánula guía, en ésta se introduce la cánula inyectora en toda su longitud. Seguidamente se inyecta 1  $\mu$ l de volumen durante 1 minuto de tiempo. Finalizado éste, se espera 1 minuto con el objeto de permitir la difusión de la sustancia a estudiar. Pasado este tiempo, se retira la cánula inyectora 1 mm y se mantiene en esta posición otro minuto con el objeto de impedir el reflujo del líquido inyectado. Finalmente, se retira la cánula inyectora, se coloca inmediatamente el fiador y se introduce el animal en la caja de experimentación.

## MATERIAL Y METODOS

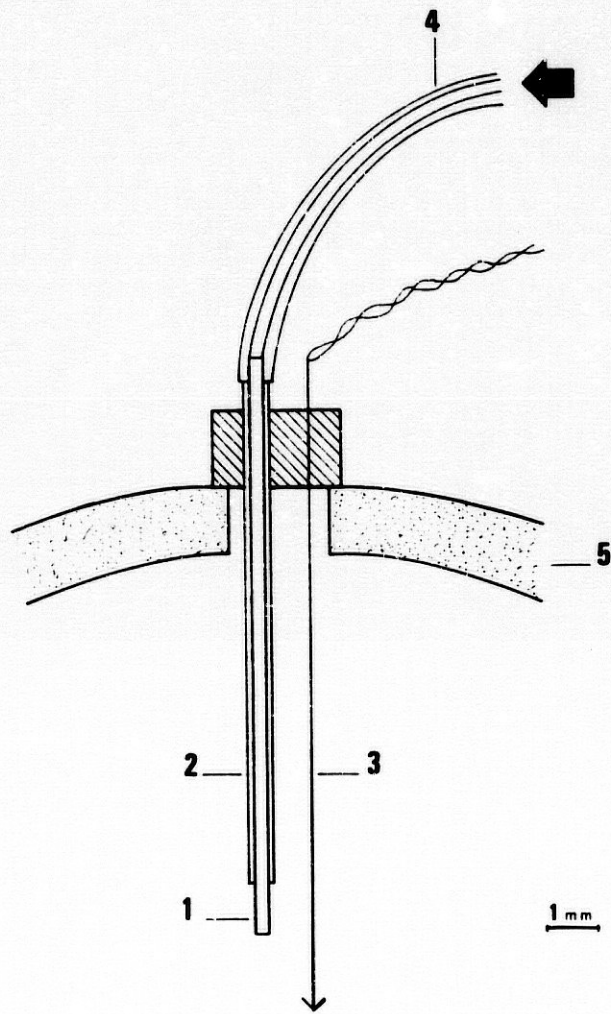


**FIGURA 13.** Ejemplo de curva intensidad-respuesta obtenida en una rata. En línea discontinua se representa la curva registrada tras la aplicación en sentido creciente del rango de intensidades utilizado (0.1-0.6 mA). En línea continua se muestra la obtenida en sentido decreciente (0.6-0.1 mA). En este caso la intensidad elegida fue 0.3 mA.



**FIGURA 14.** Estabilización de la tasa de autoestimulación a lo largo de una semana. Las oscilaciones en los resultados iniciales se reducen conforme se repite estandarizadamente la prueba.





**FIGURA 15.** Representación de la preparación utilizada en la administración intracerebral. Qemitrodo (2 y 3) y sistema de microinyección (1 y 4). 1: Cánula inyectora. 2: Cánula guía. 3: Electrodo estimulante. 4: Tubo de polietileno que va unido a la bomba de infusión por medio de una microjeringa. 5: Calota de la rata.

**5. HISTOLOGIA Y ANALISIS ESTADISTICO.**

Al final de los experimentos, los animales fueron anestesiados con equitensin y perfundidos intracardiamente con 100 ml de solución salina (CINa, 0.9%) seguido de 100 ml de una solución de formaldehído al 10%. Terminada la perfusión, se extrajo el cerebro y se cortó en secciones de 40  $\mu\text{m}$  de grosor en un microtomo de congelación. Estas secciones fueron posteriormente teñidas con cresil violeta. La posición de las cánulas y electrodos se verificó y se cotejó con el atlas estereotáxico de la rata de Paxinos y Watson (1986) mediante análisis microscópico de las preparaciones histológicas.

El estudio estadístico de los resultados fue realizado mediante la aplicación de un análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnett.



## RESUMEN DE LA METODOLOGIA SEGUIDA EN LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS.

### GENERAL.

En todos los animales utilizados se implantaron bilateralmente cánulas y electrodos en la corteza prefrontal medial. Las coordenadas estereotáxicas de la corteza prefrontal medial fueron las siguientes:

- 3.7 mm anterior a bregma.
- 0.8 mm lateral a la línea media.
- 2.8 mm por debajo de la superficie cortical.

En todos los experimentos, la administración intracerebral de los distintos neuropéptidos se realizó unilateralmente en la corteza prefrontal medial. A excepción del experimento 4 (ver más adelante), se registró la autoestimulación en ambas cortezas prefrontales.

La autoestimulación obtenida en la corteza prefrontal contralateral a la microinyección fue utilizada como control de los posibles efectos inespecíficos, alteraciones motoras, sedación ...etc, producidos por la acción de los neuropéptidos. Para descartar, igualmente, posibles efectos inespecíficos producidos por el vehículo en el que fueron disueltos los neuropéptidos (suero salino fisiológico, ClNa 0.9%) o por la manipulación mecánica del sitio de inyección, en todos nuestros experimentos se estudiaron los efectos de la microinyección del vehículo sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal. Todas las microinyecciones realizadas tuvieron un volumen de 1  $\mu$ l.

### EXPERIMENTO 1.

En este experimento se estudiaron los efectos de la microinyección de salino y de NT a las dosis de 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 nmol, sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial en un grupo de 6 animales. El procedimiento fue el siguiente: se registró la tasa de autoestimulación durante 5 min en cada corteza prefrontal medial. Seguidamente, se realizó la microinyección del salino o de la NT. Finalizada ésta, se registró la tasa de autoestimulación en ambas cortezas prefrontales en periodos alternantes de 5 min de duración, comenzándose siempre por la corteza inyectada. Se finalizó a los 55 min postinyección. La tasa de autoestimulación obtenida en cada corteza prefrontal antes de la microinyección fue utilizada como control para el estudio estadístico de los resultados obtenidos.

### EXPERIMENTO 2.

En este experimento se estudiaron los efectos de la microinyección de salino y de xenopsina a las dosis de 1.8, 3.6, 7.2 y 14.4 nmol, sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial en un grupo de 4 animales. El procedimiento utilizado es el

## MATERIAL Y METODOS

descrito para el experimento 1.

### EXPERIMENTO 3.

En este experimento se estudiaron los efectos de la microinyección de salino y de neuromedina N a las dosis de 2.5, 5, 10, 20, y 40 nmol, sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial en un grupo de 8 animales. El procedimiento utilizado fue el siguiente: se registró la tasa de autoestimulación durante 5 min en una corteza prefrontal medial; seguidamente, se realizó la microinyección de salino o de neuromedina N en dicha área cortical. Finalizada ésta, se registró la tasa de autoestimulación en la corteza prefrontal inyectada durante periodos de 5 min hasta los 30 min postinyección. Se repitieron las inyecciones de neuromedina N a las dosis de 20 y 40 nmol, pero en este caso se registró la tasa de autoestimulación de la corteza prefrontal contralateral a la inyección. Como en los experimentos anteriores la tasa de autoestimulación obtenida antes de la microinyección fue utilizada como control para el estudio estadístico de los resultados obtenidos.

### EXPERIMENTO 4.

En este experimento se estudiaron los efectos de la microinyección de salino y de NT 1-11 a las dosis de 10, 20 y 40 nmol, en un grupo de 5 animales. El procedimiento utilizado fue el siguiente: se registró la tasa de autoestimulación en una corteza prefrontal medial durante 10 min divididos en dos periodos de 5 min; seguidamente, se realizó la microinyección de salino o de NT 1-11 en dicha corteza prefrontal. Finalizada ésta, se registró la tasa de autoestimulación de la corteza inyectada. Ya que ni el salino, ni la NT 1-11, a las dosis utilizadas, produjeron efectos significativos sobre la autoestimulación de la corteza ipsilateral no se estudiaron los efectos de la administración de NT 1-11 sobre la autoestimulación de la corteza contralateral.



**RESULTADOS**

## RESULTADOS

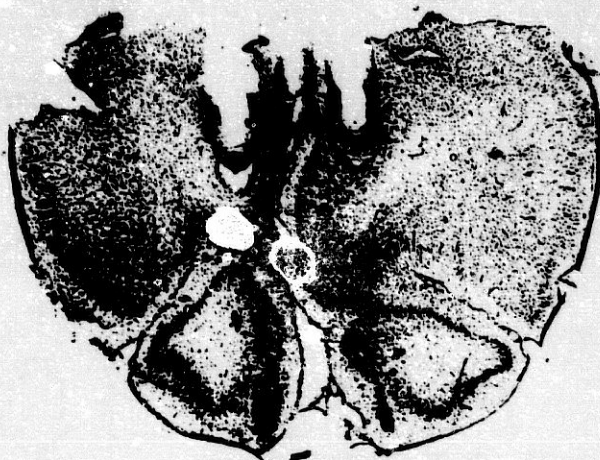
En todos los animales utilizados se implantaron bilateralmente cánulas y electrodos en la corteza prefrontal medial. La localización estereotáxica de las cánulas, utilizadas para la microinyección de las diversas sustancias estudiadas, estuvo comprendida entre los planos 5.2 mm y 4.2 mm, anterior a bregma (atlas de Paxinos y Watson, 1986). La localización estereotáxica de los electrodos, utilizados para la autoestimulación, estuvo comprendida entre los planos 5.2 mm y 3.7 mm, anterior a bregma (atlas de Paxinos y Watson, 1986).

La figura 16 muestra un ejemplo de la localización y trayecto de los electrodos y de las cánulas en ambas cortezas prefrontales en uno de los animales utilizados. Como puede observarse en esta figura, los electrodos se situaron en las capas profundas (V y VI) del área prefrontal (Krettek y Price, 1977a). Precisamente en estas capas es donde se localizan las terminales de la vía meso-cortico-prefrontal.

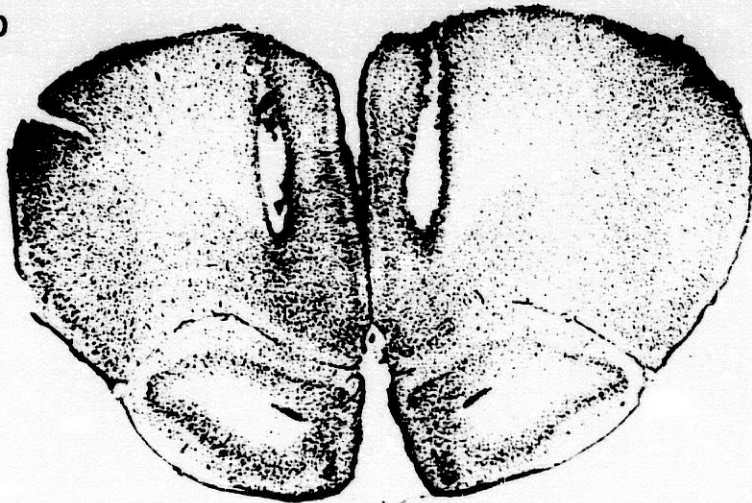


**FIGURA 16.** Microfotografía en la que se muestra la localización de cánulas (a) y electrodos (b) en ambas cortezas prefrontales mediales en uno de los animales utilizados.

a



b





**EXPERIMENTO 1. Efectos de la administración intracortical de NEUROTENSINA sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial.**

Los efectos de la administración unilateral en la corteza prefrontal medial de NT sobre la autoestimulación de ambas cortezas prefrontales, pueden observarse en las tablas 1.1 y 1.2 y en las gráficas 1.1 y 1.2.

Como puede observarse en la gráfica 1.1, la microinyección de NT produjo un descenso dosis-relacionado en la autoestimulación del lado ipsilateral. Este descenso fue estadísticamente significativo a las dosis de 1.25, 2.5, 5 y 10 nmol en los 5 min tras la administración del neuropéptido y a la dosis de 5 nmol en los 15 minutos tras la microinyección. Por el contrario, la autoestimulación en el lado contralateral no se modificó significativamente (gráfica 1.2). La administración de salino no produjo efectos significativos sobre la autoestimulación de ninguna de las cortezas prefrontales estudiadas.

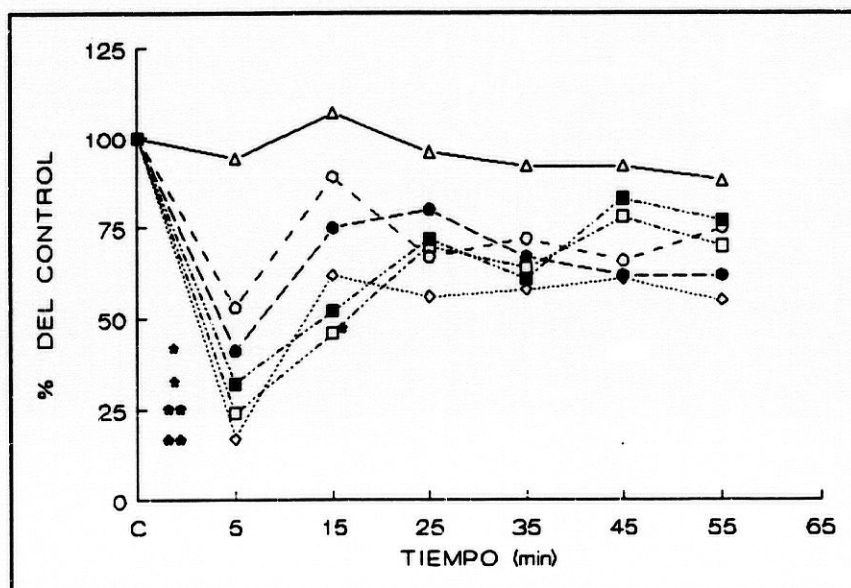
Los efectos diferenciales de la administración de NT sobre la autoestimulación en ambas cortezas prefrontales pueden observarse más claramente en la gráfica 1.3. En esta gráfica se muestran los efectos de la administración de NT, a las dosis de 5 nmol, sobre la autoestimulación en ambas cortezas prefrontales.

	TIEMPO POSTINYECCION (minutos)						
	CONTROL	0 - 5'	10 - 15'	20 - 25'	30 - 35'	40 - 45'	50 - 55'
<b>SALINO</b>	157.2 ± 21.6	149.7 ± 17.0	168.2 ± 17.5	151.5 ± 15.4	144.2 ± 16.3	145.8 ± 11.9	137.8 ± 8.0
<b>NT</b> <b>0.625nM</b>	204.3 ± 4.4	109.8 ± 39.3	182.0 ± 30.4	137.8 ± 28.2	148.5 ± 24.0	133.7 ± 16.6	153.8 ± 16.9
<b>NT</b> <b>1.25 nM</b>	181.8 ± 11.4	73.5 ± 36.9 *	136.3 ± 29.0	146.2 ± 12.9	122.3 ± 13.7	112.2 ± 16.1	111.8 ± 15.8
<b>NT</b> <b>2.5 nM</b>	177.5 ± 7.3	32.3 ± 25.5 **	119.0 ± 34.5	108.3 ± 30.6	111.0 ± 26.6	117.7 ± 28.3	106.5 ± 31.1
<b>NT</b> <b>5.0 nM</b>	167.3 ± 24.3	43.3 ± 24.9 **	81.6 ± 26.8 *	122.7 ± 15.2	112.2 ± 11.9	138.2 ± 16.0	119.2 ± 8.6
<b>NT</b> <b>10.0 nM</b>	141.8 ± 15.6	46.0 ± 29.9 *	73.6 ± 29.6	102.6 ± 27.0	87.2 ± 24.4	118.0 ± 15.4	109.3 ± 25.7

**TABLA 1.1.** Efectos de la microinyección intracortical unilateral de neurotensina (NT) y de salino sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial ipsilateral a la inyección en un grupo de 6 animales. En cada casilla se representa la media y el error estándar de la media. \*\* P < 0.01; \* P < 0.05. Control: tasa de autoestimulación durante los 5 minutos previos a cada inyección.



RESULTADOS



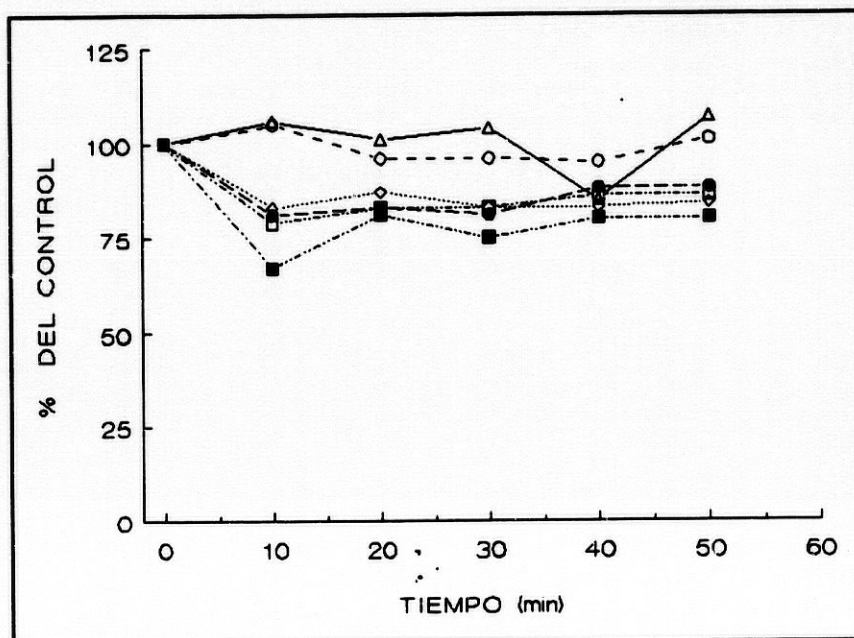
**GRAFICA 1.1.** Representación, en tantos por cien respecto de control (C), de los datos recogidos en la tabla 1.1. En abscisas, se representa el tiempo expresado en minutos y en ordenadas el porcentaje de autoestimulación. \*\* P < 0.01; \* P < 0.05. ( ) Salino, (○) 0.625 nM, (●) 1.25 nM, (◇) 2.5 nM, (□) 5.0 nM, (■) 10.0 nM.

	TIEMPO POSTINYECCION ( minutos )					
	CONTROL	5 - 10'	15 - 20'	25 - 30'	35 - 40'	45 - 50'
<b>SALINO</b>	164.7 ± 25.4	176.8 ± 24.3	167.7 ± 22.2	172.5 ± 22.9	141.8 ± 26.5	177.5 ± 24.6
<b>NT 0.625 nM</b>	188.0 ± 25.4	196.7 ± 26.8	180.5 ± 32.4	180.0 ± 20.4	171.0 ± 9.9	195.0 ± 20.3
<b>NT 1.25 nM</b>	186.5 ± 18.6	150.2 ± 29.0	154.5 ± 8.1	151.3 ± 10.4	163.8 ± 14.9	164.2 ± 16.5
<b>NT 2.5 nM</b>	182.0 ± 19.8	149.0 ± 29.0	156.8 ± 19.4	150.3 ± 17.9	149.5 ± 15.9	152.6 ± 15.3
<b>NT 5 nM</b>	162.3 ± 15.7	128.3 ± 15.0	109.0 ± 10.1	135.5 ± 12.9	135.1 ± 9.8	140.2 ± 11.4
<b>NT 10 nM</b>	167.3 ± 24.3	112.3 ± 24.5	136.2 ± 13.6	126.3 ± 8.6	133.8 ± 6.8	134.2 ± 5.3

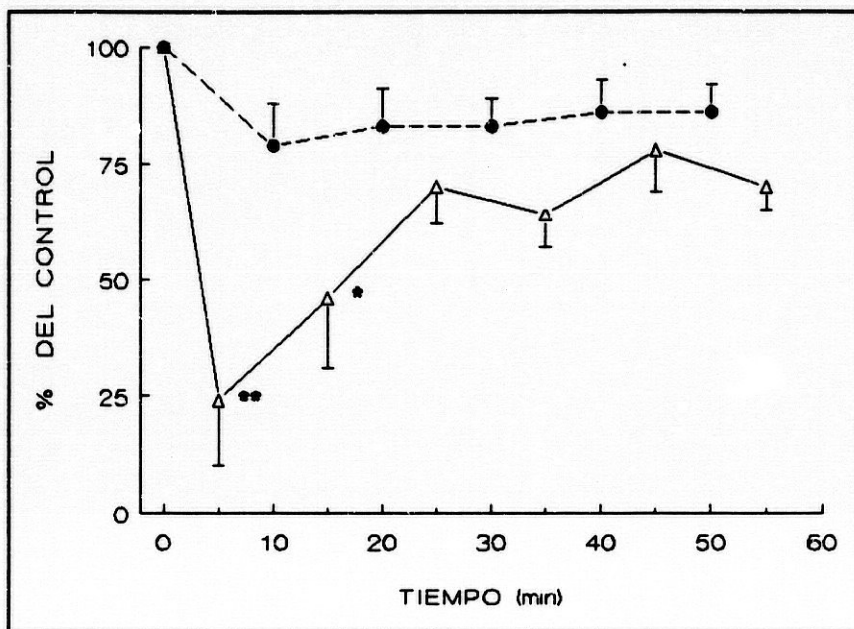
**TABLA 1.2.** Efectos de la microinyección intracortical unilateral de NT y de Salino sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial contralateral a la inyección en un grupo de 6 animales. En cada casilla se representa a la media y al error estándar de la media. Control: tasa de autoestimulación durante los 5 minutos previos a la inyección.



## RESULTADOS



**GRAFICA 1.2.** Representación, en tantos por cien respecto del control (C), de los datos recogidos en la tabla 1.2. En abscisas se representa el tiempo expresado en minutos y en ordenadas el porcentaje de autoestimulación. Los símbolos de las dosis son similares a los de la gráfica 1.1.



**GRAFICA 1.3.** En esta gráfica se muestran los efectos diferenciales de la microinyección intracortical de neurotensina a la dosis de 5 nmol sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial ipsilateral ( ● ) y contralateral ( ▲ ) (datos obtenidos de las tablas 1.1 y 1.2). En abscisas se representa el tiempo expresado en minutos y en ordenadas el porcentaje de autoestimulación.



## RESULTADOS

### **EXPERIMENTO 2. Efectos de la administración intracortical de XENOPSINA sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial.**

Los efectos de la administración unilateral en la corteza prefrontal medial de xenopsina sobre la autoestimulación en ambas cortezas prefrontales pueden observarse en las tablas 2.1 y 2.2 y en las gráficas 2.1 y 2.2.

Como puede observarse en la gráfica 2.1, la microinyección de xenopsina produjo un descenso dosis relacionado de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial ipsilateral. Este descenso fue estadísticamente significativo a las dosis de 7.2 y 14.4 nmol en los 5 minutos tras la administración del péptido, y a la dosis de 14.4 nmol en los 45 y 55 minutos tras la microinyección. Por el contrario, la autoestimulación en el lado contralateral no se modificó significativamente (gráfica 2.2). La administración de salino no produjo efectos significativos en la autoestimulación de ninguna de las cortezas prefrontales estudiadas.

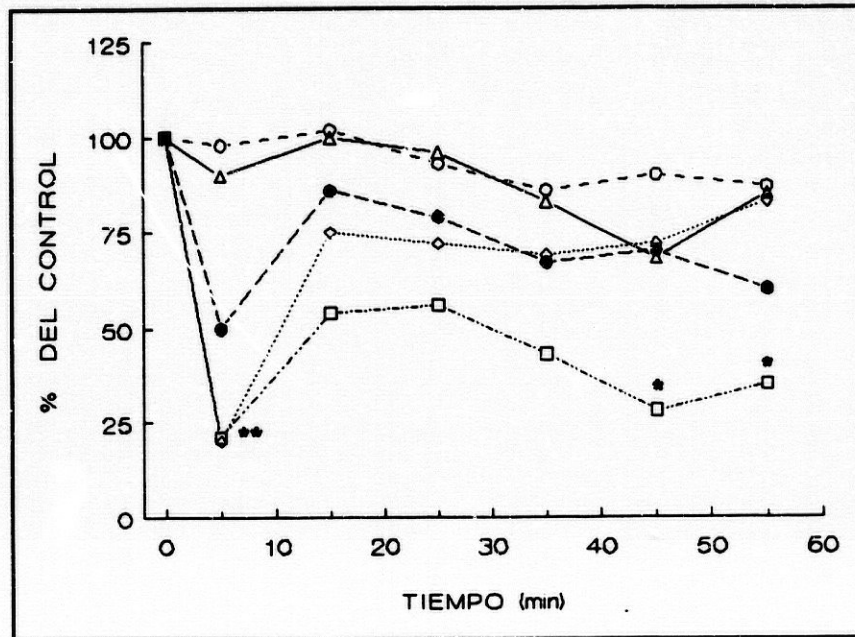
Los efectos diferenciales de la administración de xenopsina sobre la autoestimulación en ambas cortezas prefrontales pueden observarse más claramente en la gráfica 2.3. En esta gráfica se muestran los efectos de la administración de xenopsina, a la dosis de 14.4 nmol, sobre la autoestimulación en ambas cortezas prefrontales.

	TIEMPO POSTINYECCION ( minutos )						
	CONTROL	0 - 5'	10 - 15'	20 - 25'	30 - 35'	40 - 45'	50 - 55'
<b>SALINO</b>	140.4 ± 14.4	126.3 ± 30.2	140.4 ± 23.7	134.7 ± 35.3	116.5 ± 14.9	95.4 ± 26.6	119.3 ± 19.2
<b>XENOPSINA</b> 1.8 nM	181.2 ± 15.3	175.0 ± 14.3	183.2 ± 21.3	166.2 ± 23.8	154.2 ± 12.1	161.7 ± 25.1	150.0 ± 17.8
<b>XENOPSINA</b> 3.6 nM	199.0 ± 13.9	99.7 ± 33.5	170.7 ± 22.5	158.0 ± 15.5	132.7 ± 37.5	140.0 ± 26.1	120.5 42.7
<b>XENOPSINA</b> 7.2 nM	162.7 ± 12.9 **	32.5 ± 17.8	121.7 ± 16.6	117.5 ± 16.2	111.0 ± 15.7	116.2 ± 27.8	134.5 ± 21.7
<b>XENOPSINA</b> 14.4 nM	192.2 ± 10.2 **	40.7 ± 29.5	104.2 ± 34.2	108.2 ± 38.1	84.5 ± 32.6	54.0 ± 17.6 *	67.0 ± 32.7 *

**TABLA 2.1.** Efectos de la microinyección intracortical unilateral de xenopsina y de salino sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial ipsilateral a la inyección en un grupo de 4 animales. En cada casilla se representa la media y el error estándar de la media. \*\* P < 0.01; \* P < 0.05. Control: tasa de autoestimulación durante los cinco minutos previos a la inyección.



RESULTADOS



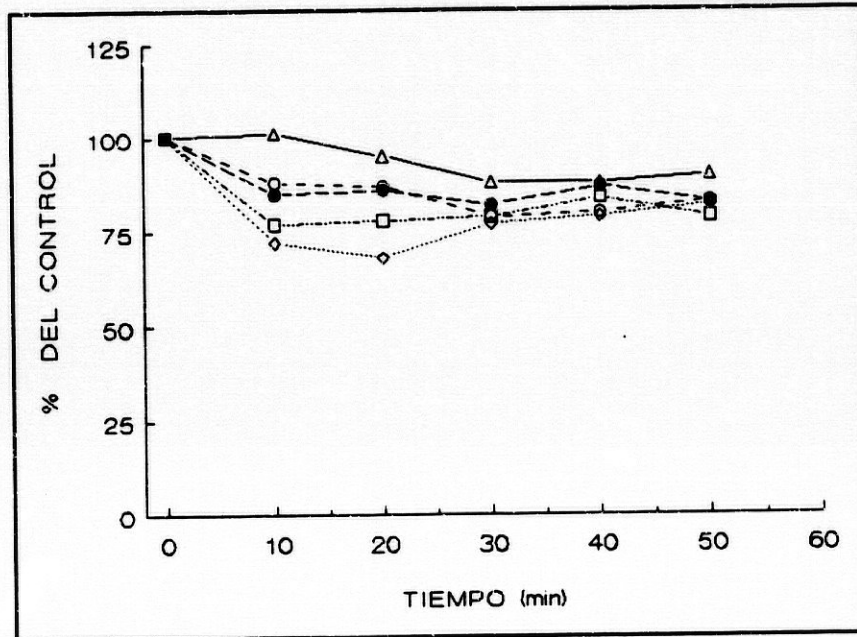
**GRAFICA 2.1.** Representación, en tantos por cien respecto del control (C), de los datos recogidos en la tabla 2.1. En abcisas se representa el tiempo expresado en minutos y en ordenadas el porcentaje de autoestimulación. \*\* P < 0.01; \* P < 0.05. ( ) Salino, ( ) 1.8 nM, ( ) 3.6 nM, ( ) 7.2 nM, ( ) 14.4 nM.

	TIEMPO POSTINYECCION ( minutos )					
	CONTROL	5 - 10'	15 - 20'	25 - 30'	35 - 40'	45 - 50'
<b>SALINO</b>	125.5 ± 23.9	126.8 ± 16.0	119.2 ± 11.6	110.4 ± 14.4	110.4 ± 11.6	112.9 ± 14.4
<b>XENOPSINA 1.8 nM</b>	185.7 ± 27.1	164.2 ± 15.4	162.0 ± 15.3	147.7 ± 16.2	148.2 ± 19.2	154.2 ± 21.1
<b>XENOPSINA 3.6 nM</b>	181.5 ± 10.2	154.2 ± 6.9	156.0 ± 4.5	149.2 ± 20.4	157.0 ± 19.4	151.2 ± 12.6
<b>XENOPSINA 7.2 nM</b>	154.2 ± 28.0	111.0 ± 29.6	105.0 ± 9.1	119.2 ± 12.3	121.2 ± 16.3	126.7 ± 24.2
<b>XENOPSINA 14.4 nM</b>	190.2 ± 25.2	147.2 ± 23.7	148.2 ± 17.5	151.5 ± 7.4	158.7 ± 10.3	150.5 ± 10.2

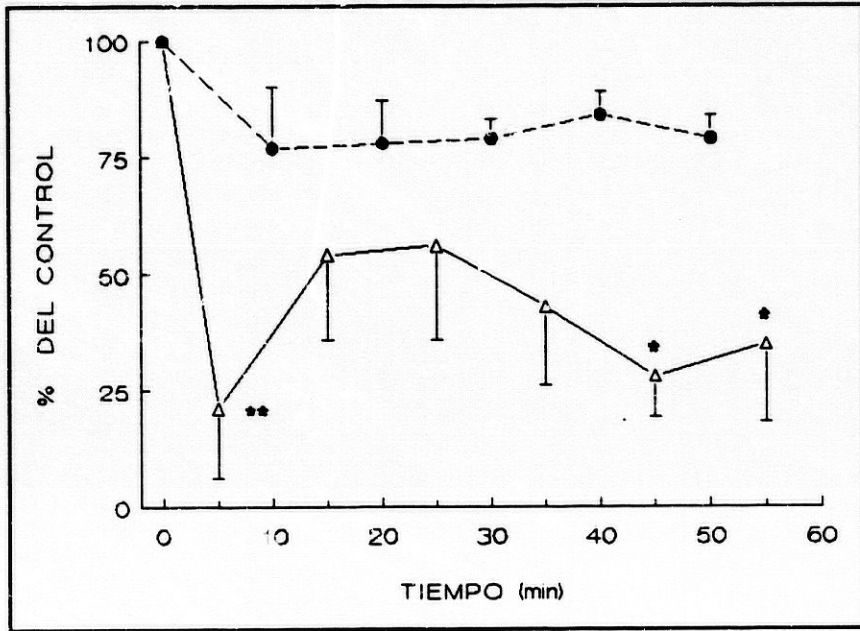
**TABLA 2.2.** Efectos de la microinyección intracortical unilateral de xenopsina sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial contralateral a la inyección en un grupo de 4 animales. En cada casilla se representa la media y el error estándar de la media. Control: tasa de autoestimulación durante los 5 minutos previos a la inyección.



## RESULTADOS



**GRAFICA 2.2.** Representación, en tantos por cien respecto del control (C), de los datos recogidos en la tabla 2.2. En abscisas se representa el tiempo expresado en minutos y en ordenadas el porcentaje de autoestimulación. Los símbolos de las dosis son similares a los de la gráfica 2.1.



**GRAFICA 2.3.** En esta gráfica se muestran los efectos diferenciales de la microinyección intracortical de xenopsina a la dosis de 14.4 nmol sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial ipsilateral (▲) y contralateral (●) (datos obtenidos de las tablas 2.1 y 2.2). En abscisas se representa el tiempo expresado en minutos y en ordenadas el porcentaje de autoestimulación.



## RESULTADOS

### **EXPERIMENTO 3. Efectos de la administración intracortical de NEUROMEDINA N sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial.**

Los efectos de la administración unilateral de neuromedina N en la corteza prefrontal medial sobre la autoestimulación de ambas cortezas prefrontales pueden observarse en la tabla 3.1 y en las gráficas 3.1 y 3.2.

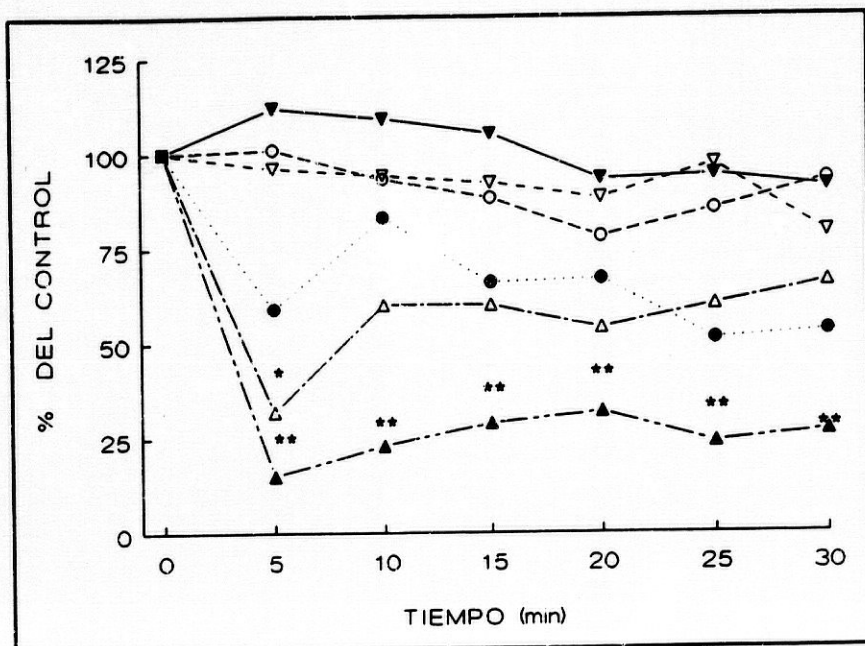
Como puede observarse en la gráfica 3.1, la microinyección de neuromedina N produjo un descenso dosis-relacionado en la autoestimulación en el lado ipsilateral. Este descenso fue estadísticamente significativo a las dosis de 20 nmol en los 5 min tras la administración del péptido y durante todo el tiempo del estudio (30 min) para la dosis de 40 nmol. Por el contrario la autoestimulación en el lado contralateral medida tras la administración de neuromedina N a la dosis de 20 y 40 nmol no se modificó significativamente (gráfica 3.2). La administración de salino no produjo efectos significativos sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal.

	TIEMPO POSTINYECCION ( minutos )						
	Control	0 - 5'	5 - 10'	10 - 15'	15 - 20'	20 - 25'	25 - 30'
<b>CORTEZA IPSILATERAL</b>							
<b>SALINO</b>	155.5 ± 14.8	174.2 ± 19.3	169.4 ± 21.0	163.2 ± 16.3	146.1 ± 14.4	144.2 ± 18.8	141.5 ± 19.2
<b>NN 2.5 nM</b>	189.5 ± 22.0	182.0 ± 22.4	178.1 ± 25.0	174.7 ± 18.8	166.1 ± 17.2	183.8 ± 9.8	149.7 ± 13.6
<b>NN 5 nM</b>	181.5 ± 19.6	176.5 ± 20.7	164.7 ± 18.1	155.3 ± 15.4	137.5 ± 20.9	150.0 ± 22.8	164.1 ± 24.1
<b>NN 10 nM</b>	148.8 ± 15.1	87.6 ± 15.3	112.1 ± 15.3	101.3 ± 24.4	104.0 ± 25.6	77.3 ± 21.2	82.8 ± 24.3
<b>NN 20 nM</b>	183.5 ± 19.5 *	59.7 ± 16.8 *	110.5 ± 29.6	110.5 ± 25.3	99.2 ± 22.2	110.5 ± 20.0	121.5 ± 19.4
<b>NN 40 nM</b>	210.7 ± 18.7	32.5 ± 14.9 **	49.0 ± 17.2 **	62.2 ± 20.2 **	68.1 ± 21.2 **	51.5 ± 19.7 **	56.6 ± 23.2 **
<b>CORTEZA CONTRALATERAL</b>							
<b>NN</b>	157	134.8	136.16	142.6	158.5	143.8	136.3
<b>20 nM</b>	± 19.9	± 8.0	± 18.1	± 18.8	± 17.3	± 20.0	± 13.8
<b>NN</b>	130.0	104.0	103.5	110.6	115.1	116.0	111.5
<b>40 nM</b>	± 21.2	± 14.4	± 12.5	± 14.4	± 16.9	± 16.9	± 13.8

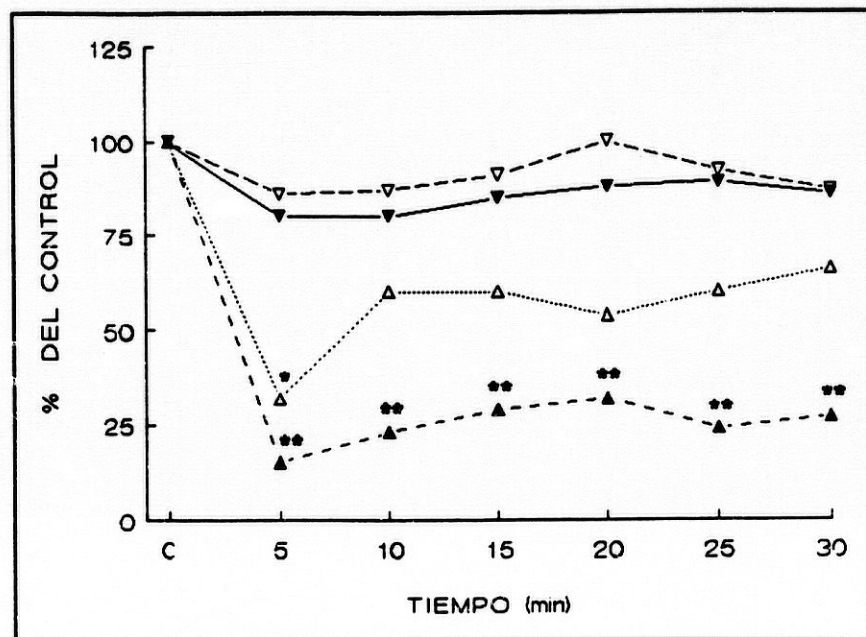
**TABLA 3.1.** Efectos de la microinyección intracortical unilateral de neuromedina N (NN) y de salino sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial ipsilateral a la inyección en un grupo de 8 animales. Se muestran también los efectos de la administración de neuromedina N a las dosis de 20 y 40 nmol sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal contralateral. En cada casilla se representa la media y el error estándar de la media. \*\* P < 0.01; \* P < 0.05. Control: tasa de autoestimulación durante los 5 min previos a la inyección.



RESULTADOS



**GRAFICA 3.1.** Representación, en tantos por cien respecto del control (C), de los datos recogidos en la tabla 3.1. En abscisas se representa el tiempo expresado en minutos y en ordenadas el porcentaje de autoestimulación. \*\* P < 0.01; \* P < 0.05. (▼) Salino, (▽) 2.5 nM, (○) 5 nM, (●) 10 nM, (△) 20 nM, (▲) 40 nM.



**GRAFICA 3.2.** Representación, en tantos por cien respecto del control (C), de los efectos sobre la autoestimulación en ambas cortezas prefrontales de la administración unilateral de neuromedina N a las dosis de 20 y 40 nmol y cuyos datos vienen recogidos en la tabla 3.1. En abscisas se representa el tiempo expresado en minutos y en ordenadas la tasa de autoestimulación. \*\* P < 0.01; \* P < 0.05. (▽) 20 nM. Contral. (△) 20 nM. Ipsilat. (▼) 40 nM. Contral., (▲) 40 nM. Ipsilat.



## RESULTADOS

### **EXPERIMENTO 4. Efectos de la administración intracortical de NEUROTENSINA 1-11 sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial.**

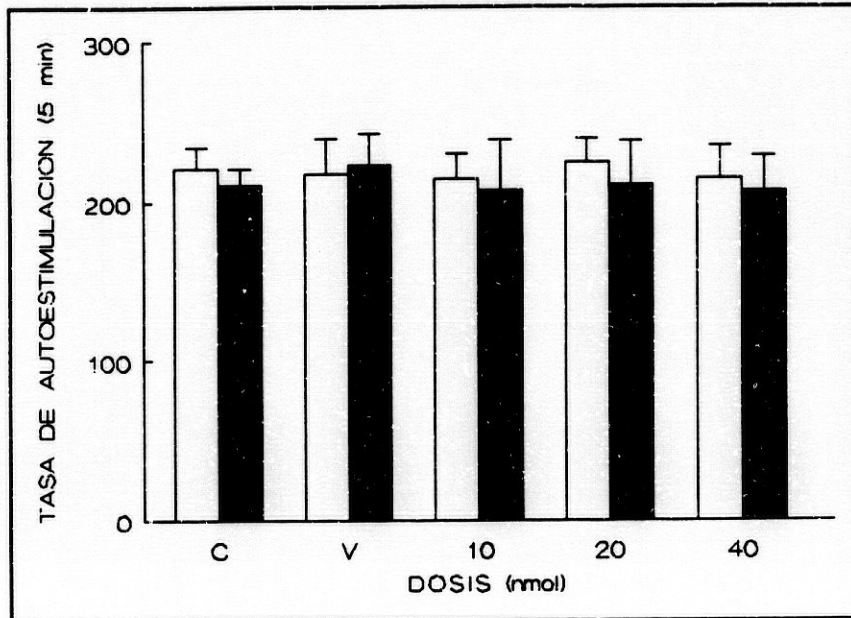
Los efectos de la administración unilateral en la corteza prefrontal medial de NT 1-11 sobre la autoestimulación en la corteza ipsilateral, pueden observarse en la tabla 4.1 y en la gráfica 4.1. Como puede observarse en la gráfica 4.1, la NT 1-11 no afectó significativamente la tasa de autoestimulación a ninguna de las dosis empleadas (10, 20 y 40 nmol). La administración de salino tampoco produjo efectos significativos sobre la autoestimulación.

	Control	SALINO	NT 1-11	NT 1-11	NT 1-11
			10 nM	20 nM	40 nM
0 - 5'	221.2 ± 13.0	217.8 ± 22.1	215.2 ± 19.8	225.2 ± 14.6	215.4 ± 14.9
5 - 10'	210.6 ± 10.5	223.0 ± 19.6	206.8 ± 22.3	210.6 ± 27.2	208.0 ± 30.8

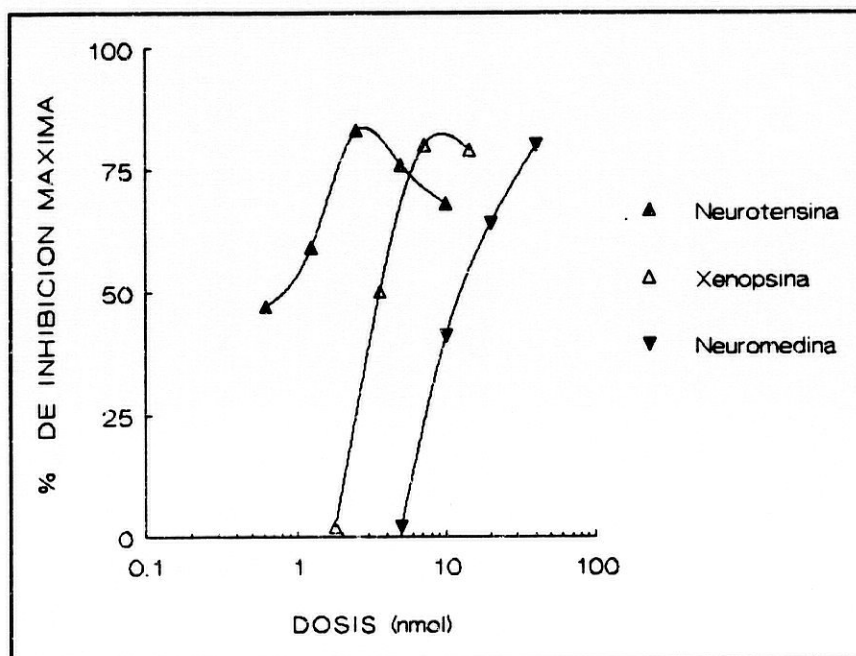
**TABLA 4.1.** Efectos de la microinyección intracortical unilateral de neurotensina 1-11 y salino (vehículo) sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial ipsilateral a la inyección en un grupo de 5 animales. En cada casilla se representa la media y el error estándar de la media. CONTROL: tasa de autoestimulación durante los diez minutos previos a la inyección divididos en dos periodos de 5 minutos.



## RESULTADOS



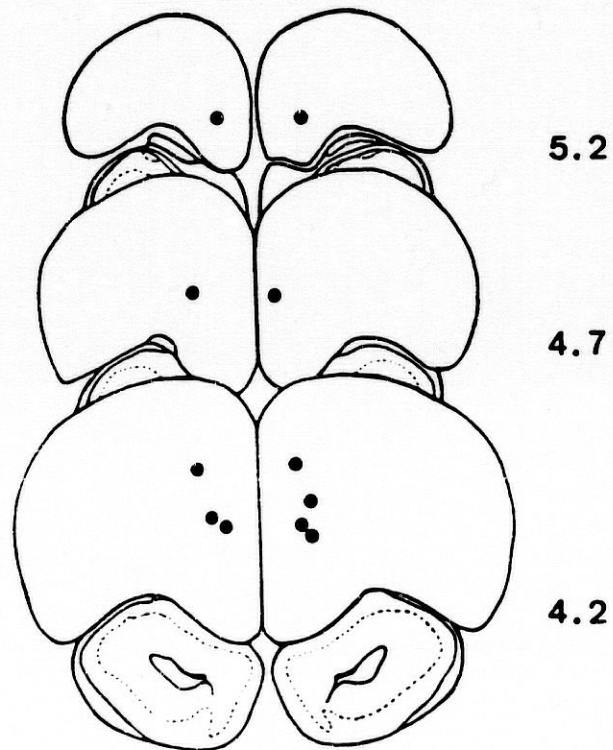
**GRAFICA 4.1.** Representación, en valores absolutos, de los datos recogidos en la tabla 4.1. En abscisas se representa las distintas dosis, el vehículo (v) y el control (C) y en ordenadas la tasa de autoestimulación. Las barras claras corresponden a los cinco primeros minutos, tanto en el control como en las inyecciones y las barras oscuras corresponde a los cinco minutos siguientes.



**GRAFICA 5.1.** Curva dosis-respuesta del porcentaje máximo de inhibición de la autoestimulación producido por neurotensina, xenopsina y neuromedina N, expresados en una escala semilogarítmica.



RESULTADOS



**FIGURA 17.** Representación esquemática de los planos estereotáxicos en los que se localizó el extremo de los electrodos en los animales utilizados en el experimento 3. Los números se refieren a la distancia en mm con respecto a bregma (atlas de Paxinos y Watson, 1986).

**DISCUSION**



**SOBRE EL DISEÑO EXPERIMENTAL**

En los estudios neurofarmacológicos sobre la autoestimulación, la administración de los fármacos puede realizarse por diversas vías. Así, para demostrar la participación de un determinado neurotransmisor en la autoestimulación de la corteza prefrontal se han empleado inyecciones subcutáneas, intraperitoneales, intraventriculares e intracorticales de diversos fármacos (Olds y Fobes, 1991; Mora y Ferrer, 1986). La administración intracortical, a diferencia del resto de las mencionadas anteriormente, permite determinar si los efectos obtenidos con un fármaco se deben o no a una acción directa del mismo sobre el área estudiada (Ferrer, 1984). En la presente Tesis Doctoral la administración intracortical ha sido la utilizada en todos los experimentos realizados. En concreto, se llevaron a cabo microinyecciones intracorticales unilaterales en la corteza prefrontal medial de los diversos neuropéptidos estudiados.

Para una interpretación correcta de los resultados obtenidos tras la administración intracortical de una sustancia es necesario la realización de diversos controles con el objeto de descartar posibles efectos inespecíficos debidos a:

- 1) la manipulación mecánica del área estudiada.
- 2) posibles efectos del solvente en el que la sustancia a estudiar se halla disuelta.
- 3) posibles efectos secundarios de la sustancia a estudiar que enmascaren o distorsionen los resultados obtenidos sobre la autoestimulación cerebral.

En relación con los puntos 1 y 2, en todos nuestros experimentos se estudiaron los efectos sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal de la administración del solvente (CINa 0.9%) en idénticas condiciones experimentales a las utilizadas durante la administración del neuropéptido correspondiente. Como se muestra en la sección de Resultados, en ningún caso la administración del solvente produjo efectos sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal, descartándose totalmente que los efectos observados tras la administración de los neuropéptidos fueran debidos, bien a la manipulación mecánica del área estudiada o al solvente utilizado. El hecho de que la administración de las dosis más bajas de los neuropéptidos estudiados tampoco produjera efectos significativos sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal apoya aún más esta interpretación.

En relación con el punto tercero y para descartar la existencia de efectos secundarios de los neuropéptidos que pudieran enmascarar los resultados obtenidos sobre la autoestimulación cerebral, en todos nuestros experimentos, en los cuales las inyecciones se realizaron unilateralmente, se utilizó como control la autoestimulación de la corteza prefrontal contralateral a la inyectada. Este control es más específico que otros referidos en la literatura como es el caso de la actividad motora espontánea ya que requiere que el animal realice una actividad motora similar a la realizada durante el proceso de autoestimulación del área inyectada (Ferrer, 1984). Así, si tras la administración de un fármaco se modifica la autoestimulación del área inyectada pero no la del área utilizada como control se puede inferir que los resultados obtenidos en la autoestimulación de la primera son específicos y no debidos a posibles efectos secundarios. Como puede

observarse en la sección de Resultados, la administración unilateral de los neuropéptidos estudiados no produjo efectos significativos en la autoestimulación de la corteza prefrontal contralateral a la inyectada. Estos resultados sugieren que los efectos obtenidos sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal inyectada son específicos y reflejan los efectos de dichos neuropéptidos sobre la conducta estudiada sin otro tipo de interferencia.

El orden de administración de las diferentes dosis de los neuropéptidos estudiados se realizó al azar y entre cada inyección hubo al menos cuatro días de separación. Este diseño del protocolo experimental se basa en evidencias previas que muestran que los efectos de la administración de neuropéptidos se ven modificados tanto por el orden de administración de las distintas dosis como por la frecuencia de las inyecciones. Así Rompré et al. (1992) han demostrado que la administración intracerebral de NT a la dosis de 20  $\mu$ g facilita la autoestimulación cerebral en la sustancia gris periacueductal cuando es administrada en primer lugar y no tiene efecto cuando se administra después de varias dosis menores previas. Por otra parte Elliot y Nemeroff (1986) han demostrado la existencia de sensibilización de los receptores de NT tras la administración diaria de este neuropéptido. Hecho que no ocurre cuando es administrado con una frecuencia temporal menor (Rompré et al., 1992).

En resumen, nuestro diseño experimental ha tenido en cuenta todos los aspectos necesarios para una interpretación correcta de los resultados obtenidos, realizándose los controles que hemos considerado más idóneos para tal fin.

#### **SOBRE EL PAPEL DE LA NEUROTENSINA EN LA AUTOESTIMULACION DE LA CORTEZA PREFRONTAL.**

Como se ha mostrado en la sección de Resultados, la microinyección unilateral de NT en la corteza prefrontal medial produce un descenso dosis-relacionado de la autoestimulación en este área cortical. El hecho de que la autoestimulación de la corteza prefrontal contralateral, no inyectada, no se afectara y que la administración del solvente no produjera ningún efecto sobre la autoestimulación cerebral sugiere una acción selectiva y local de la NT sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial.

En contraste con estudios previos (Nemeroff y Cain, 1985), las dosis de NT utilizadas en nuestro estudio son muy bajas (rango nanomolar) y están consideradas dentro del rango fisiológico de actividad del neuropéptido (Schotte y Leysen, 1989). Esto, junto con el hecho de que cada microinyección de NT fue seguida de al menos 4 días sin tratamiento, descartan cualquier posibilidad de cambios en las características de los receptores de NT que modifiquen su respuesta fisiológica. Faggin y Cubeddu (1990) han demostrado la existencia de una desensibilización de los receptores de NT sólo cuando se utilizan dosis de 1  $\mu$ mol o mayores. Por otra parte, se ha descrito la existencia de una sensibilización de los receptores de NT cuando ésta se administra diariamente (Elliot y Nemeroff, 1986), pero no cuando se utilizan frecuencias temporales menores de administración, como es nuestro caso (Rompré et al., 1992).

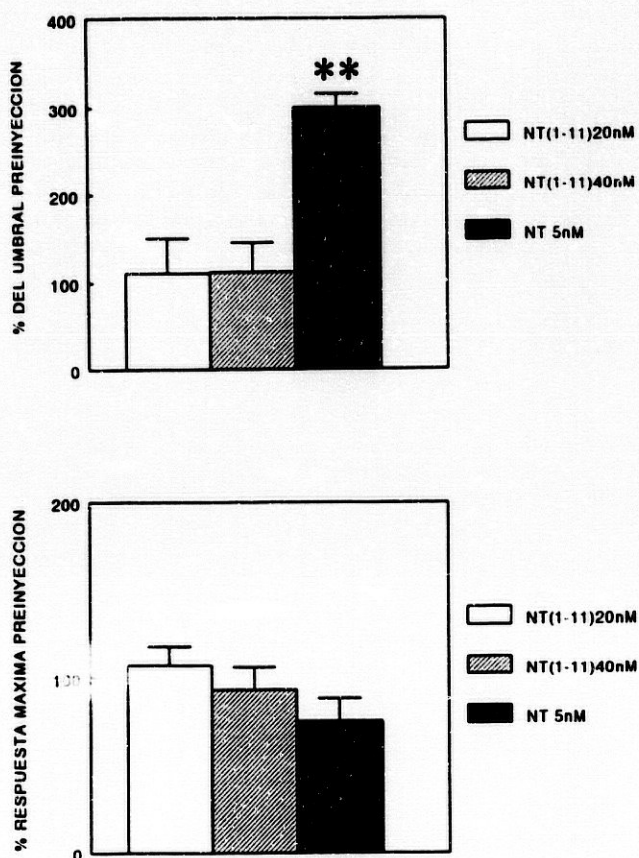
Estos resultados sugieren que la NT forma parte del sustrato neuroquímico que subyace al proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata, ejerciendo un papel inhibitorio de dicha conducta en esta área cerebral.



## DISCUSION

Los efectos inhibitorios de la NT en la autoestimulación de la corteza prefrontal de la rata también pueden ser demostrados cuando se utiliza el paradigma de estimulación de curvas frecuencia-respuesta. En los experimentos presentados en la sección de Resultados se ha utilizado una frecuencia constante de estimulación de 100 Hz. En la actualidad, diversos grupos utilizan un paradigma distinto denominado curvas de frecuencia-respuesta (Nakajima y Baker, 1989; Rompré et al., 1992). El modelo de curvas de frecuencia-respuesta consiste en registrar la tasa de autoestimulación durante periodos de tiempo que oscilan entre 1 y 2 min, según los diversos autores, a diferentes frecuencias. En primer lugar se registra la tasa de autoestimulación cuando las frecuencias se aplican en orden creciente y posteriormente se repite en orden decreciente, derivándose el valor de la tasa de autoestimulación para cada frecuencia de la media de los valores obtenidos en cada presentación. El resultado es una curva sigmoidea donde la tasa de autoestimulación crece con el incremento de la frecuencia hasta obtener un *plateau* en las frecuencias más altas. En esta curva destacan dos puntos: uno es el *valor máximo* de tasa de autoestimulación que se obtiene y otro la frecuencia a la que se obtiene el 50% de la tasa máxima de autoestimulación, a esta frecuencia se le denomina *umbral*. Los efectos facilitatorios sobre la autoestimulación de un tratamiento experimental se verían reflejados por un desplazamiento hacia la izquierda de la curva y por consiguiente un valor menor del umbral del obtenido durante los controles. El desplazamiento hacia la derecha de la curva y el aumento del umbral reflejaría una inhibición. Si el valor máximo de la tasa de autoestimulación obtenido durante el tratamiento experimental no es significativamente diferente del obtenido durante el control, los efectos del tratamiento reflejarían una acción selectiva sobre el proceso de autoestimulación sin interferencia de efectos secundarios, como pueden ser sedación o alteraciones motoras (Nakajima y Baker, 1989; Rompré et al., 1992).

En un grupo de 4 animales se estudiaron los efectos de la administración intracortical de NT a la dosis de 5 nmol y de NT 1-11 a las dosis de 20 y 40 nmol sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial medida mediante el método de curva frecuencia-respuesta. En nuestro caso, las frecuencias utilizadas fueron 8, 12, 20, 30, 50, 80, 120 y 200 Hz. En cada frecuencia se registró la tasa de autoestimulación durante 2 min. Como muestra la figura 18, la NT produjo un aumento significativo del valor umbral, mientras que no se modificó significativamente el valor máximo. Por el contrario la NT 1-11 no produjo cambios significativos en ninguno de estos dos parámetros. Estos resultados confirman los obtenidos con la NT mediante el modelo de frecuencia fija y que están expresados en la sección de Resultados y enfatizan el efecto inhibitorio de este neuropéptido en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial en la rata. Los resultados obtenidos con la NT 1-11 serán comentados en el capítulo siguiente de esta Discusión.



**FIGURA 18.** Efectos de la administración intracortical de NT a la dosis de 5 nmol y de NT 1-11 a las dosis de 20 y 40 nmol sobre los valores umbral (a) y máximo (b), expresados en tantos por cien respecto del correspondiente valor control preinyección, en un grupo de 4 animales. Las barras representan la media y las líneas verticales el error estándar de la media. \* \* P < 0.01.

La participación de la NT en la autoestimulación de la corteza prefrontal se ve apoyada por los resultados obtenidos con la xenopsina y la neuromedina N, dos neuropéptidos análogos a la NT y con la que comparten características estructurales y



## DISCUSION

La participación de la NT en la autoestimulación de la corteza prefrontal se ve apoyada por los resultados obtenidos con la xenopsina y la neuromedina N, dos neuropéptidos análogos a la NT y con la que comparten características estructurales y funcionales.

La xenopsina es un octapéptido que se obtiene de la piel del sapo *Xenopus laevis*. De su secuencia aminoacídica los cuatro últimos aminoácidos son idénticos a los de la NT (ver tabla 1, pág 31). La xenopsina se une con gran afinidad a los receptores de NT y presenta características funcionales similares a la NT, tanto centrales como periféricas (Kitabgi et al., 1985). En relación a las centrales, se ha demostrado que la xenopsina mimetiza las propiedades electrofisiológicas de la NT sobre las neuronas dopaminérgicas nigrales produciendo una excitación sobre las mismas (Pozza et al., 1988). Igualmente, como la NT, su administración intraventricular produce hipotermia (Bishoff et al., 1988). Todos estos datos han llevado a considerar a la xenopsina como un agonista natural de la NT (Pozza et al., 1988).

Como se muestra en la sección de Resultados, al igual que la NT, la microinyección de xenopsina en la corteza prefrontal produce un descenso selectivo y dosis-relacionado de la autoestimulación de este área cortical. Es interesante destacar que en nuestro estudio la xenopsina parece ser menos potente que la NT en disminuir la tasa de autoestimulación. Esto contrasta con estudios previos *in vitro* que muestran que la xenopsina es más potente que la NT en la activación de las células dopaminérgicas de la sustancia negra (Pozza et al., 1988). Este comportamiento diferente de la xenopsina puede reflejar la existencia de una especificidad regional en cuanto al modo de acción o a los receptores implicados. Hasta el presente no está claro si los efectos producidos por la xenopsina están mediados por receptores de NT, de xenopsina o de ambos (Pozza et al., 1988).

La neuromedina N, es un hexapéptido que pertenece a la familia de péptidos relacionados con la NT y comparte con ésta los cuatro últimos aminoácidos en posición C-terminal (ver tabla 1, pág 31), una característica que probablemente explica la capacidad de la neuromedina N para interactuar con los receptores de NT en la membranas sinápticas de las neuronas del cerebro de rata (Checler et al., 1986).

En cuanto a las propiedades funcionales de la neuromedina N, se han podido demostrar similitudes con la NT. Así, Dubuc et al. (1988) demostraron que la neuromedina N, como la NT, induce hipotermia al ser inyectada intraventricularmente en el cerebro de la rata. Este estudio confirmaba un trabajo previo que demostraba que la neuromedina N, al igual que la NT, puede ejercer un efecto similar a los neurolépticos cuando es microinyectada en el área ventrotectal y en el núcleo accumbens, que se corresponden con el origen y las terminales de la vía dopaminérgica mesolímbica (Kalivas et al., 1986). No obstante y a pesar de las similitudes entre ambos neuropéptidos, estos autores describieron un perfil farmacológico diferente para la neuromedina N y para la NT. Además, la neuromedina N es más potente que la NT en aumentar la actividad motora espontánea tras su microinyección en el área ventrotectal, mientras que es menos potente que la NT en inhibir la conducta hiperactiva inducida por la dopamina al ser inyectada en el núcleo accumbens (Kalivas et al., 1986). Es de destacar también que ambos péptidos son degradados de forma diferente en las membranas sinápticas del

cerebro de rata (ver figura 4, pág 25). Estos resultados evidencian la existencia de similitudes y diferencias en las propiedades funcionales de dichos neuropéptidos.

En relación a nuestro estudio, y como se muestra en la sección de Resultados, la microinyección unilateral de neuromedina N, en la corteza prefrontal medial, al igual que la NT y la xenopsina, produce un descenso dosis-relacionado de la autoestimulación de este área cortical. En conjunto, estos resultados apoyan fuertemente la participación de la NT en el sustrato neuroquímico implicado en el proceso de autoestimulación de la corteza prefrontal en la rata.

#### **SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA NEUROTENSINA EN LA AUTOESTIMULACION DE LA CORTEZA PREFRONTAL.**

En relación con el mecanismo o los mecanismos de acción implicados en los efectos descritos de la NT sobre el proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal de la rata y en base a la literatura existente aparecen dos posibilidades principalmente.

1) Que los efectos de la NT sean debidos a la existencia de una interacción entre NT y dopamina. Bien debido a la capacidad quelante de la NT sobre la dopamina, o a la modulación por la NT de la liberación presináptica de dopamina, como consecuencia de interrelaciones intramembrana entre los receptores de NT y dopamina.

2) Que los efectos de la NT sean debidos a la actividad de este neuropéptido sobre sus propios receptores, situados a nivel postsináptico en la corteza prefrontal.

En relación con la primera posibilidad, y como ha sido comentado en la Introducción, existe un cuerpo documental muy amplio que demuestra la existencia de una íntima relación funcional entre NT y dopamina en los tres sistemas dopaminérgicos centrales de la rata más importantes; el nigroestriatal, el mesolímbico y el mesocortical. En este sentido se ha propuesto que parte de los efectos de la NT pueden ser debidos a la capacidad de este neuropéptido en formar complejos extracelulares con la dopamina que impiden la actuación de la catecolamina sobre sus receptores. La inhibición de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial observada en nuestro estudio podría ser debida a esta capacidad quelante de la NT sobre la dopamina. No obstante existen diversos aspectos de nuestro estudio que parecen descartar dicha posibilidad. En primer lugar, el rango de dosis utilizado con la NT en nuestro estudio (igual o inferior a 10 nmol) es muy inferior al requerido (dosis iguales o superiores a 10  $\mu$ mol) para producir este efecto quelante sobre la dopamina. Y en segundo lugar, está el hecho de que la xenopsina, un análogo de la NT con una capacidad de quelación muy inferior al de la NT, ya que posee solamente una Arginina en posición 9 (Adachi et al., 1990), produce efectos similares sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal. No obstante y para descartar definitivamente la participación de este mecanismo en los efectos de la NT sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal, se estudiaron los efectos de la administración de neuromedina N y del fragmento NT 1-11.

La neuromedina N tiene la propiedad de unirse con gran afinidad a los receptores de NT, pero carece de actividad quelante (Adachi et al, 1990), al no presentar en su molécula la pareja de argininas (ver tabla 1, pág 31). Por el contrario, la NT 1-11 tiene una





MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART  
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS  
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a  
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

cerebro de rata (ver figura 4, pág 25). Estos resultados evidencian la existencia de similitudes y diferencias en las propiedades funcionales de dichos neuropéptidos.

En relación a nuestro estudio, y como se muestra en la sección de Resultados, la microinyección unilateral de neuromedina N, en la corteza prefrontal medial, al igual que la NT y la xenopsina, produce un descenso dosis-relacionado de la autoestimulación de este área cortical. En conjunto, estos resultados apoyan fuertemente la participación de la NT en el sustrato neuroquímico implicado en el proceso de autoestimulación de la corteza prefrontal en la rata.

#### **SOBRE EL MECANISMO DE ACCION DE LA NEUROTENSINA EN LA AUTOESTIMULACION DE LA CORTEZA PREFRONTAL.**

En relación con el mecanismo o los mecanismos de acción implicados en los efectos descritos de la NT sobre el proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal de la rata y en base a la literatura existente aparecen dos posibilidades principalmente.

1) Que los efectos de la NT sean debidos a la existencia de una interacción entre NT y dopamina. Bien debido a la capacidad quelante de la NT sobre la dopamina, o a la modulación por la NT de la liberación presináptica de dopamina, como consecuencia de interrelaciones intramembrana entre los receptores de NT y dopamina.

2) Que los efectos de la NT sean debidos a la actividad de este neuropéptido sobre sus propios receptores, situados a nivel postsináptico en la corteza prefrontal.

En relación con la primera posibilidad, y como ha sido comentado en la Introducción, existe un cuerpo documental muy amplio que demuestra la existencia de una íntima relación funcional entre NT y dopamina en los tres sistemas dopaminérgicos centrales de la rata más importantes; el nigroestriatal, el mesolímbico y el mesocortical. En este sentido se ha propuesto que parte de los efectos de la NT pueden ser debidos a la capacidad de este neuropéptido en formar complejos extracelulares con la dopamina que impiden la actuación de la catecolamina sobre sus receptores. La inhibición de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial observada en nuestro estudio podría ser debida a esta capacidad quelante de la NT sobre la dopamina. No obstante existen diversos aspectos de nuestro estudio que parecen descartar dicha posibilidad. En primer lugar, el rango de dosis utilizado con la NT en nuestro estudio (igual o inferior a 10 nmol) es muy inferior al requerido (dosis iguales o superiores a 10  $\mu$ mol) para producir este efecto quelante sobre la dopamina. Y en segundo lugar, está el hecho de que la xenopsina, un análogo de la NT con una capacidad de quelación muy inferior al de la NT, ya que posee solamente una Arginina en posición 9 (Adachi et al., 1990), produce efectos similares sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal. No obstante y para descartar definitivamente la participación de este mecanismo en los efectos de la NT sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal, se estudiaron los efectos de la administración de neuromedina N y del fragmento NT 1-11.

La neuromedina N tiene la propiedad de unirse con gran afinidad a los receptores de NT, pero carece de actividad quelante (Adachi et al, 1990), al no presentar en su molécula la pareja de argininas (ver tabla 1, pág 31). Por el contrario, la NT 1-11 tiene una



## DISCUSION

actividad quelante similar al de la NT, pero no se une a los receptores de la misma debido a la falta de los dos últimos aminoácidos, Isoleucina-leucina (ver tabla 1, pág 31), que son fundamentales para dicha propiedad (Checler et al., 1986). Como se muestra en la sección de Resultados, la neuromedina N produce una inhibición de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial, mientras que la NT 1-11 no tiene ningún efecto, como también se evidencia con el paradigma de curvas frecuencia-respuesta (ver figura 18, pág 92). Estos resultados permiten sugerir que la capacidad quelante de la NT sobre la dopamina no es un mecanismo implicado en los efectos de este neuropéptido sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal.

Descartado el mecanismo de quelación, la mediación de la dopamina en los efectos de la NT obtenidos en nuestro estudio podría ser debida a la modulación por dicho neuropéptido a nivel presináptico de la liberación de dopamina, como ha sido demostrado que ocurre en el estriado de rata (Fuxe et al., 1992). En este sentido es importante destacar que Hetier et al. (1988) ha demostrado que, en preparaciones *in vitro* de rodajas de corteza prefrontal de rata, la NT potencia la liberación de dopamina. No obstante, durante la autoestimulación de la corteza prefrontal ya existe, de hecho, un importante aumento de la liberación de dopamina (Mora y Myers, 1977) y en tales circunstancias la modulación de dicha liberación por la NT puede o no tener lugar o, de tenerlo, ser funcionalmente insignificante. Para la dilucidación final de este punto se hace imprescindible la realización de futuros experimentos.

En relación con el segundo mecanismo propuesto, cabe la posibilidad de que los efectos de la NT sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial sean debidos a la acción de este neuropéptido sobre sus propios receptores situados en las neuronas intrínsecas no dopaminérgicas de la corteza prefrontal, que son un elemento fundamental en el mantenimiento de dicho fenómeno (Ferrer et al., 1985). Recientes estudios apoyan, aunque de una manera indirecta, esta interpretación. En este sentido, Schotte y Leysen (1989) han demostrado que tras la lesión de la vía mesocortical dopaminérgica con 6-hidroxidopamina, el número de receptores de NT aumenta en la corteza prefrontal, justo lo contrario de lo obtenido en el estriado o en el núcleo acumbens. Estos resultados sugieren que, en la corteza prefrontal, los receptores de NT parecen estar localizados predominantemente en las neuronas intrínsecas prefrontales que establecen sinapsis con las terminales mesocorticales. Esto contrasta con la localización predominante de los receptores de NT en las terminales de las vías dopaminérgicas nigroestriatal y mesolímbica (Palacios y Kuhar, 1981; Quirion et al., 1985; Dilts y Kalivas, 1989; Schotte y Leysen, 1989). Por otra parte, Audinat et al., (1989) ha mostrado que la aplicación *in vitro* de NT en rodajas de corteza prefrontal de rata produce una despolarización en la mayoría de las células estudiadas y que este efecto se debe a la acción del neuropéptido sobre sus receptores. Estas evidencias permiten sugerir que los efectos de la NT sobre el proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal pueden deberse a la acción de este neuropéptido sobre las neuronas intrínsecas no dopaminérgicas prefrontales. Muy recientemente, Gully et al., (1993) han descrito las propiedades de la sustancia denominada SR 48692 y que parece cumplir las exigencias de una antagonista selectivo de NT. Sería muy interesante el estudiar los efectos del SR 48692 en la autoestimulación de la corteza prefrontal.

Es interesante destacar que, en la corteza prefrontal de la rata, la localización

## DISCUSION

actividad quelante similar al de la NT, pero no se une a los receptores de la misma debido a la falta de los dos últimos aminoácidos, Isoleucina-leucina (ver tabla 1, pág 31), que son fundamentales para dicha propiedad (Checler et al., 1986). Como se muestra en la sección de Resultados, la neuromedina N produce una inhibición de la autoestimulación en la corteza prefrontal medial, mientras que la NT 1-11 no tiene ningún efecto, como también se evidencia con el paradigma de curvas frecuencia-respuesta (ver figura 18, pág 92). Estos resultados permiten sugerir que la capacidad quelante de la NT sobre la dopamina no es un mecanismo implicado en los efectos de este neuropéptido sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal.

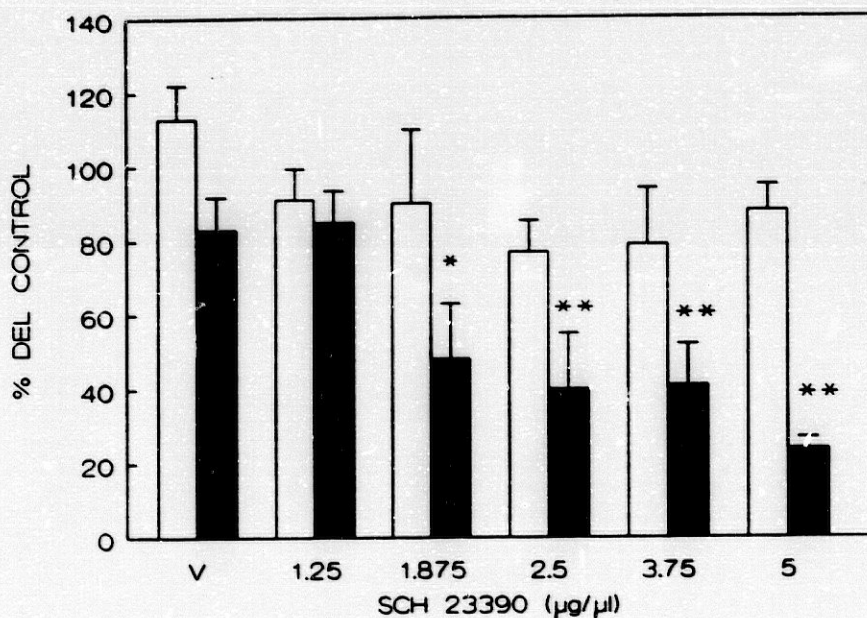
Descartado el mecanismo de quelación, la mediación de la dopamina en los efectos de la NT obtenidos en nuestro estudio podría ser debida a la modulación por dicho neuropéptido a nivel presináptico de la liberación de dopamina, como ha sido demostrado que ocurre en el estriado de rata (Fuxe et al, 1992). En este sentido es importante destacar que Hetier et al. (1988) ha demostrado que, en preparaciones *in vitro* de rodajas de corteza prefrontal de rata, la NT potencia la liberación de dopamina. No obstante, durante la autoestimulación de la corteza prefrontal ya existe, de hecho, un importante aumento de la liberación de dopamina (Mora y Myers, 1977) y en tales circunstancias la modulación de dicha liberación por la NT puede o no tener lugar o, de tenerlo, ser funcionalmente insignificante. Para la dilucidación final de este punto se hace imprescindible la realización de futuros experimentos.

En relación con el segundo mecanismo propuesto, cabe la posibilidad de que los efectos de la NT sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial sean debidos a la acción de este neuropéptido sobre sus propios receptores situados en las neuronas intrínsecas no dopaminérgicas de la corteza prefrontal, que son un elemento fundamental en el mantenimiento de dicho fenómeno (Ferrer et al., 1985). Recientes estudios apoyan, aunque de una manera indirecta, esta interpretación. En este sentido, Schotte y Leysen (1989) han demostrado que tras la lesión de la vía mesocortical dopaminérgica con 6-hidroxidopamina, el número de receptores de NT aumenta en la corteza prefrontal, justo lo contrario de lo obtenido en el estriado o en el núcleo acumbens. Estos resultados sugieren que, en la corteza prefrontal, los receptores de NT parecen estar localizados predominantemente en las neuronas intrínsecas prefrontales que establecen sinapsis con las terminales mesocorticales. Esto contrasta con la localización predominante de los receptores de NT en las terminales de las vías dopaminérgicas nigroestriatal y mesolímbica (Palacios y Kuhar, 1981; Quirion et al., 1985; Dilts y Kalivas, 1989; Schotte y Leysen, 1989). Por otra parte, Audinat et al., (1989) ha mostrado que la aplicación *in vitro* de NT en rodajas de corteza prefrontal de rata produce una despolarización en la mayoría de las células estudiadas y que este efecto se debe a la acción del neuropéptido sobre sus receptores. Estas evidencias permiten sugerir que los efectos de la NT sobre el proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal pueden deberse a la acción de este neuropéptido sobre las neuronas intrínsecas no dopaminérgicas prefrontales. Muy recientemente, Gully et al., (1993) han descrito las propiedades de la substancia denominada SR 48692 y que parece cumplir las exigencias de una antagonista selectivo de NT. Sería muy interesante el estudiar los efectos del SR 48692 en la autoestimulación de la corteza prefrontal.

Es interesante destacar que, en la corteza prefrontal de la rata, la localización



predominantemente postsináptica de los receptores de NT coincide con la observada para los receptores dopaminérgicos  $D_1$  (ver figura 7, pág 34). Precisamente, estos receptores, y no los  $D_2$ , han sido implicados en la participación de la dopamina en la autoestimulación de la corteza prefrontal (Ferrer et al., 1983). Como se aprecia en la figura 19 la microinyección en la corteza prefrontal medial de un antagonista específico de los receptores  $D_1$ , el SCH-23390, produce una inhibición específica y dosis-relacionada de la autoestimulación en este área cortical. Estos resultados confirman los obtenidos por Ferrer et al., (1983).



**FIGURA 19.** Efectos de la administración unilateral de SCH-23390 y del solvente (V: solución de NaOH 0.1 N en suero salino fisiológico; ClNa 0.5%) en la corteza prefrontal medial sobre la autoestimulación de la corteza prefrontal medial ipsilateral (barras negras) y contralateral (barras blancas). Cada barra representa la media de la tasa de autoestimulación en 10 min de un grupo de 7 ratas expresada en tantos por cien respecto del control preinyección. Las líneas verticales representan al error estándar de la media. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

## DISCUSION

En resumen los datos anteriormente discutidos permiten sugerir que los efectos de la NT sobre el proceso de autoestimulación descritos en la presente Tesis parecen implicar la actividad de este neuropéptido sobre las células prefrontales no dopaminérgicas. No obstante, tanto para aceptar esta hipótesis como para descartar otras que impliquen la participación de la dopamina u otros de los sistemas neuroquímicos presentes en la corteza prefrontal, es imprescindible la realización de nuevas investigaciones.

Recientemente, ha sido demostrado que la neuromedina N y la NT son codificadas en la misma molécula precursora (ver figura 3, pág 25) y que ambos péptidos se distribuyen de una manera muy parecida en el sistema nervioso central, incluida la corteza prefrontal (Kitabgi et al., 1992). Por otra parte, Shi y Bunney (1991) han demostrado que neuromedina N y NT son liberados simultáneamente, en preparaciones hipotalámicas *in vitro*, y de una manera calcio dependiente. Todas estas evidencias han permitido sugerir que la neuromedina N puede ser un nuevo candidato a engrosar las filas de los péptidos neurotransmisores (Shi y Bunney, 1991). De hecho, diversos autores tienden a pensar que algunos de los efectos inicialmente atribuidos a la NT tal vez sean debidos a la neuromedina N (Rompré et al., 1992). Dado que la neuromedina N también se encuentra en las terminales dopaminérgicas prefrontales, en donde el cociente NT/neuromedina N es de 1.4 (Kitabgi et al., 1992), nuestros resultados hacen pensar en una posible participación de la neuromedina N en el proceso de autoestimulación de la corteza prefrontal.

### INTERES DEL ESTUDIO PRESENTADO EN ESTA TESIS

Como se ha comentado con anterioridad, la corteza prefrontal está involucrada en funciones cognitivas, emocionales y de memoria (Fuster, 1989). Alteraciones en este área cerebral parecen ocurrir en trastornos mentales tales como la esquizofrenia, en la que las conductas motivacionales están particularmente afectadas (Weinberger, 1988). Sin embargo, aún se conoce poco sobre los neurotransmisores implicados tanto en los aspectos funcionales, tanto normales como patológicos, con los que la corteza prefrontal ha sido relacionada. Por tanto, el conocimiento del papel funcional de los neurotransmisores existentes en este área del neocórtex resulta de un interés especial.

Ya a principios de siglo (1909), Emil Kraepelin atribuyó la enfermedad por él llamada *demencia precoz* a la lesión de los lóbulos frontales del cerebro. Kraepelin pensaba que la elaboración fundamental en la demencia precoz no era la experimentación de alucinaciones o delirios, sino un debilitamiento de la voluntad. Para él, este trastorno y las características clínicas de esta enfermedad tales como: alteración del juicio, dificultad para resolver problemas abstractos, incapacidad para planificar, embotamiento afectivo, aislamiento social y pérdida de capacidad crítica, eran indicativos de una alteración patológica en el lóbulo frontal. Parecida opinión fue sostenida por Eugen Bleuler (1911), que fue quien propuso el término de *esquizofrenia*.

En los últimos años, se han ido acumulando evidencias de la existencia de importantes alteraciones morfológicas, bioquímicas y funcionales en el sistema nervioso central en general, y en el lóbulo frontal en especial, de pacientes esquizofrénicos. Así, en



esta patología se ha demostrado la existencia de una atrofia cortical, representada por una dilatación de los surcos cerebrales y un reducción significativa del número de neuronas. Estos cambios son especialmente marcados en la corteza prefrontal (Shelton and Weinberger, 1987). Estudios *in vivo*, realizados con tomografía axial computerizada han confirmado alteraciones descritas *post mortem*, como la presencia de dilataciones en los ventrículos cerebrales (Shelton and Weinberger, 1987). Por su parte, las técnicas de medida *in vivo* tanto del flujo sanguíneo, como del metabolismo cerebral, han mostrado una disminución de ambos parámetros en la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos, en especial durante diferentes condiciones de actividad cortical producida por estimulaciones sensoriales o cognitivas (Weinberger, 1988). La magnitud de los cambios morfológicos y los de hipoactividad de la corteza prefrontal se ha correlacionado con algunos de los síntomas de defecto de la esquizofrenia.

Como ya ha sido mencionado en el capítulo anterior, la corteza prefrontal de los mamíferos, incluido el hombre, presenta una rica inervación dopaminérgica. Esta inervación dopaminérgica de la corteza prefrontal parece estar implicada en el sustrato neuroquímico de diversos aspectos funcionales relacionados con la actividad de este área cerebral (Fuster, 1989). Así, en primates, la lesión de la corteza prefrontal produce alteraciones en pruebas de discriminación espacial que requieren la participación de diversas capacidades conceptuales como son la discriminación, memoria a corto plazo y la planificación y ejecución de pruebas complejas. Estas alteraciones pueden ser reproducidas mediante la deplección experimental de dopamina de la corteza prefrontal, y revertidas con el tratamiento farmacológico de L-DOPA, o agonistas dopaminérgicos (Kandel, 1991). En el hombre, en la enfermedad de Parkinson, en donde ocurre una degeneración de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, los pacientes padecen no sólo un trastorno motor, que refleja el déficit en el sistema dopaminérgico nigroestriatal, sino también otras alteraciones como pérdida de la motivación, empobrecimiento del afecto y de la espontaneidad, defectos que parecen estar relacionados con una disminución de la transmisión nerviosa en las vías dopaminérgicas mesolímbica y mesocortical. Alteraciones de los sistemas dopaminérgicos centrales también han sido implicados en la esquizofrenia. En este sentido, se ha sugerido que en esta enfermedad existen dos alteraciones diferentes en lo que se refiere a la transmisión dopaminérgica: un aumento de actividad del sistema mesolímbico dopaminérgico, que daría lugar a los síntomas positivos y que responde bien al tratamiento con antipsicóticos y una disminución en la actividad del área prefrontal que sería la responsable de los síntomas negativos y que no responde tan positivamente al tratamiento antipsicótico (Weinberger, 1988).

Como hemos visto anteriormente, en el sistema nervioso central del mamífero existe una íntima relación funcional entre NT y dopamina. Esto ha determinado, en los últimos años, un creciente interés sobre la posible contribución de este neuro péptido en la fisiopatología de enfermedades mentales asociadas a alteraciones de la transmisión dopaminérgica y en consecuencia la apertura de nuevas vías terapéuticas. En este sentido, es importante destacar aquí el hecho de que la NT presenta un perfil farmacológico en parte similar al de los neurolépticos (Snidgers et al., 1982; Luttinger et al., 1982).

Los estudios realizados sobre la implicación de la NT en enfermedades mentales, han puesto de manifiesto la existencia de alteraciones en la neurotransmisión de este péptido en pacientes que sufren de enfermedad de Parkinson (Uhl et al., 1984), esquizofrenia (Manberg et al., 1982; Widerlov et al., 1982b) y corea de Huntington

#### DISCUSION

(Emson et al., 1985). Así, diversos autores han descrito en pacientes esquizofrénicos niveles de NT en el líquido cefalorraquídeo inferiores a la media de los encontrados en el grupo control (Widerlov et al., 1982b; Nemeroff et al., 1989). Es interesante destacar que los niveles normales de NT en líquido cefalorraquídeo se pueden recuperar tras un mes de tratamiento con neurolépticos. Más recientemente, Garver et al., 1991, han descrito que en un grupo de pacientes psicóticos los niveles bajos de NT en el líquido cefalorraquídeo están asociados con un retraso significativo en la respuesta al tratamiento con drogas antipsicóticas, pero no en la respuesta al litio. Por otra parte, Nemeroff et al., (1983), en estudios *post mortem*, han demostrado la existencia de un aumento en las concentraciones de NT en el área 32 de Brodman de cerebros procedentes de pacientes esquizofrénicos. Estudios realizados sobre otras alteraciones mentales como la depresión, enfermedad de Alzheimer o la anorexia y la bulimia, no han mostrado alteraciones en la neurotransmisión neurotensinérgica (Nemeroff et al., 1989).

Como se ha comentado ampliamente en secciones anteriores, en la rata, se ha demostrado que la dopamina y la NT coexisten en las mismas terminales mesocorticales. Y lo que es más interesante, estos neurotransmisores se pueden liberar distintamente en función de parámetros electrofisiológicos y farmacológicos (Bean y Roth, 1992). En el primate y en el hombre esta coexistencia no ocurre (Gaspar et al., 1990; Deutch y Zahn, 1992). No obstante, esto no descarta la existencia de una interrelación entre estos neurotransmisores en la corteza prefrontal de los mamíferos superiores, así como su posible implicación en los trastornos mentales anteriormente citados en el hombre y el desarrollo futuro de fármacos antipsicóticos más selectivos.



**CONCLUSIONES**

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

**PRIMERA.** La administración intracortical de neurotensina, xenopsina y neuromedina N disminuye selectivamente la autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata.

**SEGUNDA.** La capacidad quelante de la neurotensina sobre la dopamina no es el mecanismo implicado en los efectos de dicho neuropéptido sobre la autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata.

**TERCERA.** Los efectos obtenidos tras la administración de los neuropéptidos estudiados sugieren la participación de la neurotensina en el sustrato neuroquímico que subyace al proceso de autoestimulación en la corteza prefrontal medial de la rata.

**CUARTA.** La neuromedina N es, posiblemente, un nuevo neurotransmisor implicado en la autoestimulación de la corteza prefrontal medial de la rata.



**BIBLIOGRAFIA**

#### BIBLIOGRAFIA

- Adachi, D.K., Kalivas, P.W. and Schenk, J.O., 1990, Neurotensin binding to dopamine. - *J. Neurochem.* 54: 1321-1328.
- Andrade, R. and Aghajanian, G.K., 1981, Neurotensin selectively activates dopamine neurons in the sustancia nigra, *Soc. Neurosci. Abstr.* 7: 573.
- Audinat, E., Hermel, J.M. and Crepel, F., 1989, Neurotensin-induced excitation of neurons of the rat's frontal cortex studied intracellularly in vitro, *Exp. Brain Res.* 78: 358-368.
- Backus, L.I., Stellar, J.R., Jacob, J., Hesse, G.W. and Shashova, V.E., 1988, Novel GABA agonists depresses the reward effect of lateral hypothalamic stimulation in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30: 657-63.
- Bartfai, T., Iverfelt, K., Fisone, G. and Serfozo, P., 1988, Regulation of the release of coexisting neurotransmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28: 285-310.
- Bean, A.J., Adrian, T.E., Modlin, I.M. and Roth, R.H., 1989, Dopamine and neurotensin storage in colocalized neuronal populations, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 681-687.
- Bean, A.J., M.J. During and R.H. Roth, 1989, Stimulation induced release of coexistent transmitter in the prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study of dopamine and neurotensin release, *J. Neurochem.* 53: 655-657.
- Bean, A.J. and Roth, R.H., 1992, Dopamine-Neurotensin interaction in mesocortical neurons. Evidence from microdialysis studies, in: *The neurobiology of neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.H. B. Nemeroff. (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 43-53.
- Beaudet, A. and Woulfe, J., 1992, Morphological substrate for neurotensin-dopamine interactions in the rat midbrain tegmentum, in: *The neurobiology of Neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.B. Nemeroff, (Annals of The New York Academy of Sciences), pp. 173-183.
- Beckstead, R.M., 1979, An autoradiographic examination of the cortical and subcortical projections of the mediodorsal projection (prefrontal) cortex in the rat, *J. Comp. Neurol.* 184: 43-62.
- Berger, B., Thierry, A.M., Tassin, J.P. and Moyne M.A., 1976, Dopaminergic innervation of the rat prefrontal cortex: a fluorescence histochemical study, *Brain Res.* 106: 133-145.
- Bielajew, C. and Shizgal, P., 1986, Evidence implicating descending fibers in self-stimulation of the medial prebrain bundle, *J. Neurosci.* 6: 919-929.
- Bischoff, S., Heinrich, M., K ng, E., Pozza, M., Schaub, St cklin and Vassout, A., 1988, The neurotensin analogue xenopsin also excited nigral dopamine neurons and induces hypothermia, *Soc. Neurosci. Abstr.* 17.



- Bissette, G., Dole, K., Johnson, M., Knight, D. and Nemeroff, C.B., 1988, Antipsychotic drugs increase neurotensin concentrations after destruction of dopamine neurons by 6-OHDA, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 14: 1211.
- Bleuler, E., 1911, *Dementia praecox or the group of schizophrenias*. J. Zinkin (trans.). New York: International Universities Press, 1950.
- Bloom, S.R., Edwards, A.V. and Garret, J.R., 1987, Effects of stimulating the sympathetic innervation in bursts on submandibular vascular and secretory function in cats, *J. Physiol.* 393: 91-106.
- Boyd, E.S. and Gardner, L.C., 1962, Positive and negative reinforcement from intracranial self-stimulation in teleost, *Science* 136: 648.
- Brady, J.V., 1960, Temporal and emotional effects related to intracranial electrical self-stimulation, *Electrical Studies on the Unanesthetized Brain*. E. Ramsey, D. O'Doherty (eds.), New York, Hoeber: 52-57.
- Broekkamp, C.L., Phillips, A.G. and Colls, A.R., 1979, Facilitation of self-stimulation behaviour following intracerebral microinjections of opioids into the ventral tegmental area, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11: 289-295.
- Bunney, B.S. and Aghajanian, G.K., 1976, Dopamine and norepinephrine innervated cells in the rat prefrontal cortex: pharmacological differentiation using microiontophoretic techniques, *Life Sci.* 19: 1783-1792.
- Candy, J., Perry, E., Biggins, A., Thompson, J. and Irving D., 1983, *Aging of the Brain*, W.H. Gispen y J. Traver (Eds.) Elsevier Sci. Publishers, pp. 29-48.
- Carraway, R.E. and Leeman, S.E., 1973, The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami, *J. Biol. Chem.* 248: 6854-6861.
- Carraway, R.E. and Leeman, S.E., 1976, Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat: Its differential distribution in the central nervous system, small intestine and stomach, *J. Biol. Chem.* 251: 7045-7052.
- Cazala, P., 1986, Self-stimulation behaviour can be elicited from various "aversive" brain structures, *Behav. Brain. Res.* 22: 163-171.
- Checler, F., Vicent, J.P. and Kitabgi, P., 1986, Neuromedin N: High affinity interactions with brain neurotensin receptors and rapid inactivation by brain synaptic peptidases, *Eur. J. Pharmacol.* 126: 239-244.
- Cheramy, A., Michelot, R., Leviel, V., Nieaillon, A., Glowinski, I. and Kerdelhue, B., 1978, Effects of the immunoneutralization of substance P in the cat, substantia nigra on the release of dopamine from dendrite and terminals of dopaminergic neurons, *Brain Res.* 155: 404-408.

#### BIBLIOGRAFIA

- Clavier, R.M. and Gerfen, C.R., 1982, Intracranial self-stimulation in the thalamus of the rat, *Brain Res. Bull.* 8: 353-358.
- Cobo, M., 1990, Aminoácidos acídicos y autoestimulación en la corteza prefrontal de la rata: estudio neurofarmacológico y neuroquímico, Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid.
- Cobo, M., Ferrer, J.M.R. and Mora, F., 1989, The role of the lateral cortico-cortical prefrontal pathway in self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat, *Behav. Brain Res.* 31: 257-265.
- Collier, V.T., Kurtman, S. and Routtenberg, A., 1977, Intracranial self-stimulation derived from entorhinal cortex, *Brain Res.* 137: 188-196.
- Cooper, B.R., Konkol, R.J. and Breese, G.R., 1978, Effects of catecholamine-depleting drugs and d-amphetamine on self-stimulation of the substantia nigra and locus coeruleus, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 204: 592-605.
- Corbett, D. and Wise, R.A., 1980, Intracranial self-stimulation interrelation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: A moveable electrode mapping study, *Brain Res.* 185: 1-15.
- Corbett, D., Laferrière, A. and Milner, P.M., 1982a, Elimination of medial prefrontal cortex self-stimulation following transection of efferents to the sulcal cortex in the rat, *Physiology Behavior* 29: 425-431.
- Cotman, C.W., Monaghan, D.T., Ottersen, O.P. and Storm-Mathisen, J., 1987, Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways, *TINS* 10: 273-280.
- Crawley, J.N., Stivers, J.A., Blumstein, L.K. and Paul, S.M., 1985, Cholecystokinin potentiates dopamine-mediated behaviours: evidence for a modulation specific to a site of coexistence, *J. Neurosci.* 5: 1972-1983.
- Cuello, A.C., 1983, Central distribution of opioid peptides, *Br. Med. Bull.* 39: 11-16.
- Cuello, A. and Kanazawa I., 1978, The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 178: 129-156.
- Dalsass, M., Kiser S., Mendershausen M. and German, D.C., 1981, Medial prefrontal cortical projections to the region of the dorsal periventricular catecholamine system, *Neuroscience* 6: 657-665.
- Deutch, A.Y. and Zahm, D.S., 1992, The current status of neurotensin-dopamine interactions, in: *The Neurobiology of Neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.B. Nemeroff, (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 232-252.
- Dilts, R.P. and P.W. Kalivas, 1989, Autoradiographic localization of mu opioid and neurotensin receptors within the mesolimbic dopamine system, *Brain Res.* 488: 311.



- Dinopoulos, A., Dori, I., Davies, S.W. and Parnavelas, J.G., 1989, Neurochemical heterogeneity among cortifugal and callosal projections, *Exp. Neurol.* 105: 36-44.
- Divac, I., Björklund, A. and Passingham, R.E., 1978, Converging projections from the medio-dorsal thalamic nucleus and mesencephalic dopminergic neurons to the neocortex in three species, *J. Comp. Neurol.* 180: 59-71.
- Docherty, M., Bradford, H.F. and Wu J.Y., 1987, Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes, *Nature*, 330: 64-66.
- Druhan, J.P., Fibiger, H.C. and Phillips, A.G., 1989, Differential effects of cholinergic drugs on discriminative cues and self-stimulation produced by electrical stimulation of the ventral tegmental area, *Phychopharmacology*, 97: 331-338.
- Dubuc, I., Nouel, D., Coquerel, A., Menard, J.F., Kitabgi, P. and Costentin, J., 1988, Hypothermic effect of neuromedin N in mice and its potentiation by peptidase inhibitors, *Eur. J. Pharmacol.* 151: 117-121.
- Eison, A.E., Eison, M.S. and Iversen, S.D., 1982, The behavioural effects of a novel substance P analogue following infusion into the ventraltegmental area or substantia nigra of rat brain, *Brain Res.* 238: 137-152.
- Elde, R., Schalling, M. Ceccatelli, S., Nakanishi, S. and Hökfelt, T., 1990, Localization of neuropeptides receptors mRNA in rat brain: Initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci. Lett.* 120: 134-138.
- Elliot, P.J., Alpert, J.E., Bannon, M.J. and Iversen, S.D., 1986, Selective activacation of mesolimbic and mesocortical dopamine metabolism in rat brain by infusion of a stable substance P analogue into the ventral tegmental area, *Brain Res.* 363: 145-147.
- Elliot, P.J. and C.B. Nemeroff, 1986, Repeated neurotensin administration in the ventral tegmental area: effects on baseline and d-amphetamine induced locomotor activity, *Neurosci. Lett.* 68: 239.
- Emson, P.C., 1978, Complementary distribution of dopamine, substance P and acetylcholine in the rat prefrontal cortex and septum, in *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. Ed. P.J. Roberts, (Raven Press, New York), vol. 19: 397-400.
- Emson, P.C., Horsfield, P.M., Goedert, M., Rossor, M.N. and Hawkes, C.H., 1985, Neurotensin in human brain: regional distribution and effects of neurological illness, *Brain Research*, 347: 239-244.
- Ervin, G.N., Birkermo, L.S., Nemeroff, C.B. and Prange, A.F., Jr., 1981, Neurotensin blocks certain amphetamine behaviors, *Nature* 291: 73-76.
- Esclapez, M., Campistron, G. and Trottier, S., 1987, Immunocytochemical localization and morphology of GABA-containing neurons in the prefrontal and frontoparietal cortex of the rat, *Neurosci. Lett.* 77: 131-136.

#### BIBLIOGRAFIA

Faggin, B.M. and Cubeddu, L.X., 1990, Rapid desensitization of dopamine release induced by neurotensin and neurotensin fragments, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 812-818.

Febvret, A., Berger, B., Gaspar, P. and Verney, C., 1991, Further indication that distinct dopaminergic subsets project to the rat cerebral cortex: Lack of colocalization with neurotensin in the superficial dopaminergic fields of the anterior cingulate, motor, retrosplenial and visual cortices, *Brain Res.* 547:37-52.

Fekete, M., Lengyri, A., Hegedus, B., Rentzsch, A., Schwarberg, H. and Telegdy, G., 1983, Effects of cholecystokinin octapeptides on avoidance and self-stimulation behaviour or rats, *Neurosci. Letters, suppl.* 14: 113.

Ferrer, J.M.R., Cobo, M. and Mora, F., 1987, The basolateral limbic circuit and self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat, *Physiol. Behav.* 40: 291-295.

Ferrer, J.M.R., 1984, Bases neurales de la autoestimulación de la corteza prefrontal en la rata (Granada University Press, Granada).

Ferrer, J.M.R., Cobo, M. and Mora, F., 1988, Peptides and self-timulation of the medial prefrontal cortex in the rat: Effects of intracerebral microinjections of substance P and cholecystokinin, *Peptides* 9: 1-7.

Ferrer, J.M.R., Myers, R.D. and Mora, F., 1985, Suppression of self-stimulation of the medial prefrontal cortex after local microinjection of kainic acid in the rat, *Brain Res. Bull.* 15, 225-228.

Ferrer, J.M.R., Sanguinetti, A.M., Vives, F. and Mora, F., 1983, Effects of agonists and antagonists of D1 and D2 dopamine receptors on self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19: 211-217.

Ferron, A., Thierry, A.M., Ledonarin, C. and Glowinski J., 1984, Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic system on spontaneous activity or excitatory response induced from the thalamic mediodorsal nucleus in the rat prefrontal cortex, *Brain Res.* 302: 257-265.

Fibiger, H.C., 1978, Drugs and reinforcement mechanism. A critical review of the catecholamine theory, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 37-56.

Ford, A.P.D.W. and Marsden C.A., 1990, In vivo neurochemical and behavioural effects of intracerebrally administered neurotensin and D-Trp11-neurotensin on mesolimbic and nigrostriatal dopaminergic function in the rat. *Brain Res.* 534: 243-250.

Franklin, K.B.J., 1978, Catecholamines and self-stimulation: Reward and performance effects dissociated, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9: 813-820.

Franklin, K.B.J. and Robertson A., 1982, Effects and interactions of naloxone and amphetamine on self-stimulation of the prefrontal cortex and dorsal tegmentum, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 16: 433-436.



- Fray, P.J., Dunnet, S.B., Iversen, S.D., Björklund, A. and Stenevi, U., 1983, Nigral transplants reinnervating the dopamine-stimulation, *Science*, 219: 416-419.
- Fuster, J.M., 1989, *The prefrontal cortex: anatomy, physiology and neurophysiology of the frontal lobe*, 2nd edition (Raven Press, New York).
- Fuxe, K., Von Euler, G., Agnati, L.F., Merlo, E., O'Connor, W.T., Tanganelli, S., Li, M.X., Tinner, B., Cintra, A., Carani, C. and Benfenati, F., 1992, Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like actions of neurotensin. in: *The Neurobiology of Neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.B. Nemeroff, (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 186-204.
- Gallistel, C.R. and Davis, A.J., 1983, Affinity for the dopamine D2 receptor predicts neuroleptic potency in blocking the reinforcing effect of MFB stimulation, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19: 867-872.
- Gallistel, C.R. and Freyd, G., 1987, Quantitative determination of the effects of catecholaminergic agonists and antagonists on the rewarding efficacy of brain stimulation, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 731-741.
- Gallistel, C.R., Gornita, Y., Yadin, E. and Campbell, K.A., 1985, Forebrain origins and terminations of the medial forebrain bundle metabolically activated by rewarding stimulation or by reward-blocking doses of pimozide, *J. Neurosci.* 5: 1246-1261.
- Garver, D.L., Bissette, G., Yao, J.K. and Nemeroff, C.B., 1991, CSF neurotensin concentrations in psychoses: Relationship to symptoms and drug response, *Am. J. Psychiatry* 148: 484-488.
- Gaspar, P., Berger, B. and Febvret, A., 1990, Neurotensin innervation of the human cerebral cortex: Lack of colocalization with catecholamines, *Brain Res.* 530: 181-195.
- Gerfen, Ch.R. and Clavier, R.M., 1981, Intracranial self-stimulation from the sulcal prefrontal cortex in the rats: the effect of 6-hydroxydopamine or kainic acid lesions at the site of stimulation, *Brain Res.* 224: 291-304.
- Glimcher, P.W., Margolin, B.H., Giovino, A.A. and Hoebel, B.G., 1984, Neurotensin: A new reward peptide, *Brain Res.* 291: 119.
- Glimcher, P.W., Giovino, A.A. and Hoebel, B.G., 1987, Neurotensin self-injection in the ventral tegmental area, *Brain Res.* 403: 147.
- Goodball, E.B. and Carey, R.J., 1975, Effects of d-versus l-amphetamine, food deprivation and current intensity on self-stimulation of the lateral hypothalamus, substantia nigra and medial prefrontal cortex of the rat, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89: 1029-1045.
- Goodman, I.J. and Brown J.L., 1966, Stimulation of positively and negatively reinforcing sites in the avian brain, *Life Sci.* 5: 693-704.

#### BIBLIOGRAFIA

Govoni, S., Hong, F.S., Yang, H.-Y.T. and Costa, E., 1980, Increase of neurotensin content elicited by neuroleptics in nucleus accumbens, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 215: 413-417.

Gully, D., Canton, M., Boigegrain, R., Jeanjean, F., Molimard, J.C., Poncelet, M., Gueudet, C., Heaulme, M., Leyris, R., Brouard, A. et al., 1993, Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 65-90.

Herve, D., Tassin, J.P., Studlen, J.M., Pana, D., Kitabgi, P., Vincent, J.P., Glowinski, J. and Rostene, W., 1986, Dopaminergic control of I-labeled neurotensin binding site density in corticolimbic structure of the rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6203-6207.

Hökfelt, T., Everitt, B.J., Theodorsson-Norhedin, E. and Goldstein, M., 1984, Occurrence of neurotensin-like immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic and medullary catecholamine neurons, *J. Comp. Neurol.*, 222: 543-559.

Hopkins, D.A., 1976, Hypothalamic and brainstem connections of self-stimulation pathways studied using the retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the rat, *Brain Stimulation Reward*, eds. A. Wauquier and E.T. Rolls, (North Holland, Amsterdam), pp 53-56.

Huang, Y.H. and Routtenberg, A., 1971, Lateral hypothalamic self-stimulation pathways in *rattus norvegicus*, *Physiol. Behav.* 7: 419-432.

Ito, M. and Olds, J., 1971, Unit activity during self-stimulation behavior, *J. Neurophysio.* 34: 263-273.

Iversen, L.L., Quirk, M., Emson, P.C., Dowling, J.K. and Watling, K.J., 1980, Further evidence for the existence of multiple receptors for dopamine in the central nervous system, in: *Receptors for neurotransmitters and peptide hormones*, (Raven Press, New York).

Janas, J.D. and Stellar J.R., 1987, Effects of knife-cut lesions of the medial forebrain bundle in self-stimulating rats, *Behav. Neurosci.* 101: 832-845.

Johnson, J.L. y Aprison, M.H., 1971, The distribution of glutamate and total free amino acids in thirteen specific regions of the cat CNS., *Brain Res.*, 26: 141-148.

Jolicoeur, F.B. and Menard, D., 1992, Evidence for involvement of A1 adenosine receptor in neurotensin-induced hypothermia, in: *The Neurobiology of Neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.B. Nemeroff, (*Annals of the New York Academy of Sciences*), pp. 353-355.

Jolicoeur, F.B., R. Rivest, S. St-Pierre, M.A. Gagne and M. Dumais, 1985, The effects of neurotensin and D-Tyr 11-NT on the hyperactivity induced by intra-accumbens administration of a potent dopamine receptor agonist, *Neuropeptides* 6: 143.



- Kalivas, P.W., R. Richardson-Carlson and P. Duffy, 1986, Neuromedin N mimics the actions of neurotensin in the ventral tegmental area but not in the nucleus accumbens, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 1126.
- Kalivas, P.W. and Miller, J.S., 1984, Neurotensin neurons in the ventral tegmental area project to the medial nucleus accumbens, *Brain Res.* 300: 157-160.
- Kalivas, P.W., Nemeroff, C.B. and Prange, A.J., Jr., 1982, Neuroanatomical site specific modulation of spontaneous motor activity by neurotensin, *Eur. J. Pharmacol.* 78: 471-474.
- Kandel, E.R., 1991, Disorders of thought: Schizophrenia, in: *Principles of Neural Sciences*, eds. E.R. Kandel, J.H. Schwartz, (3rd Elsevier, New York), pp 853-867.
- Kaschkow, J.W. and Nemeroff, C.B., 1991, The neurobiology of neurotensin: focus on neurotensin-dopamine interactions, *Regulatory Peptides*, 36: 153-164.
- Kelley, A.E., Stinus, L. and Iversen, S.D., 1980, Interaction between D-Ala-met-enkephalin, A10 dopaminergic neurons and spontaneous behaviour in the rat, *Behav. Brain Res.* 1: 24.
- Kitabgi, P., Checler, F., Mazella, J. and Vicent, J.P., 1985, Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptor. *Rev. Basic. Clin. Pharmacol.* 5: 397-486.
- Kitabgi, P., Nadai, F., Rovere, C. and Bidard, J.M., 1992, Biosynthesis, Maturation, Release and Degradation of neurotensin and neuromedin N, in: *The Neurobiology of Neurotensin*, eds. P. Kitabgi y Ch.B. Nemeroff, (The Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 30-42.
- Koek, W., Woods, J.H. and Ornstein P., 1986, Phencyclidine-like behavioral effects in pigeon induce by systemic administration of the excitatory amino acid antagonist, 2-amino-5-phosphonovalerate, *Life Sci.* 39: 973-978.
- Kolb B., 1984, Functions of frontal cortex of the rat: A comparative review, *Brain Research Reviews* 8: 65-98.
- Kornblith, C.L., Ervin, G.N. and King, R.A., 1978, Hypothalamic and locus coeruleus self-stimulation are decreased by cholecystokinin, *Physiol. Behav.* 21: 1037-1042.
- Kraepelin, E., 1909, Dementia praecox and paraphrenia. From Kraepelin's text-book of Psychiatry, 8th ed. R. M. Barclay (trans.). Edinburgh: Livingstone, 1919.
- Krettek, J.E. and Price, J.L., 1977a, The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat, *J. Comp. Neurol.* 171: 157-191.
- Krettek, J.E. and Price, J.L., 1977b, Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat, *J. Comp. Neurol.* 172: 157-191.
- Krieger, D.T., 1983, Brain peptides: what, where, and why?, *Sciences* 222: 957-985.

#### BIBLIOGRAFIA

- Leonard, C.M., 1969., The prefrontal cortex of the rat. I: cortical projections of the mediodorsal nucleus, II: efferent connections. *Brain Res.* 12: 321-343.
- Liebman, J. and Segal, S.D., 1977, Differential effects of morphine and d-amphetamine on self-stimulation from closely adjacent regions in rat midbrain, *Brain Res.* 136: 103-117.
- Lindvall, O. and Bjorklund, A., 1984, General organization of cortical monoamine system in: *Neurological Neurobiology, monoamine innervation of cerebral cortex.* eds. L. Descarries, T.A. Reader and H.H. Jasper (Alan Liss, New York), pp. 9-40.
- Livingston, K.E. and Escobar, A., 1971, Anatomical bias of the limbic system concept: A proposed reorientation, *Arch. Neurol.* 24: 17-21.
- Lorens, S.A., 1976b, Comparison of the effects of morphine on hypothalamic and medial frontal cortex self-stimulation in the rat, *Psychopharmacology* 48: 217-224.
- Lundberg, J.M., Rudehill, A., Sollevi, A., Fried, G. and Vallin, G., 1989, Co-release of neuropeptide Y and noradrenaline from pig spleen in vivo: Importance of subcellular storage, nerve impulse, frequency and pattern, feedback regulation and resupply by axonal transport, *Neuroscience*, 28: 475-486.
- Luttinger, D., Nemeroff, C.B. and Prange, A.F., Jr., 1982, The effects of neuropeptides on discrete trial conditioned avoidance responding, *Brain Res.*, 237, 183-192.
- Mai, J., Triepel, K.J. and Metz, J., 1987, Neurotensin in the human brain, *Neuroscience*, 22: 499-524.
- Manberg, P.J., Nemeroff, C.B., Iversen, L.L., Rossor, M.N., Kizer, J.S. and Pranger Jr., A.J., 1982, Human brain distribution of neurotensin in normals, schizophrenic and Huntington's choreics, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 400.
- Mashal, R.D., Owen, F., Deakin, J.F.W. and Poulter, M., 1983, The effects of cholecystokinin on dopaminergic mechanisms in rat striatum, *Brain Res.*, 277: 375-376.
- Mazella, J., Kitabgi, P. and Vincent, J.P., 1985, Molecular properties of neurotensin receptors in rat brain, *J. Biol. Chem.* 260: 508-514
- Merchant, K.M., Miller, M.A., Ashleigh, E.A. and Dorsa, D.M., 1991, Haloperidol rapidly increases the number of neurotensin mRNA-expressing neurons in neostriatum of the rat brain, *Brain Res.*, 484: 311-314.
- Milliaressis, E., Malette, J. and Coulombe, D., 1986, The effects of pimozide on the reinforcing efficacy of central grey stimulation in the rat, *Behav. Brain Res.* 21: 95-100.
- Mora, F., 1978, The neurochemical substrates of prefrontal cortex self-stimulation: a review and a interpretation of some recent data, *Life Sci.* 22: 919-930.



- Mora, F. and Cobo, M., 1990, The neurobiological basis of prefrontal cortex self-stimulation: A review and an integrative hypothesis, in: *The Prefrontal Cortex : its function, structure and plasticity: Progres in Brain Research*. H.B.M. Lillyings, C.G. Van Eden, J.P.C. De Bruin, M.A., Corner and M.P.G., Fenestra (eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Mora, F., Sanguinetti, A.M., Rolls, E.T. and Shaw S.G., 1975, Differential effects on self-stimulation and motor behaviour produced by microintra cranial injections of a dopamine receptor blocking agent, *Neurosci. Lett.* 1: 179-184.
- Mora, F., Rolls, E.T., Burton, M.J. and Shaw, S.G., 1976, Effects of dopamine-receptor blockade on self-stimulation in the monkey, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4: 211-216.
- Mora, F., Myers, R.D. and Sanguinetti, A.M., 1977, Self-stimulation of the MFB or VTA after microinjection of haloperidol into the prefrontal cortex of the rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 6: 236-241.
- Mora, F., Avriith, D.B. and Rolls, E.T., 1980, An electrophysiological and behavioural study of self-stimulation in the orbitofrontal cortex of the rhesus monkey, *Brain Res. Bull.* 5: 111-115.
- Mora, F. and Ferrer, J.M.R., 1986, Neurotransmitters, pathways and circuits as the neural substrate of self-stimulation of the prefrontal cortex: Facts and speculations, in: *The neuronal basis of reward and aversion, Behav. Brain Res. (Special issue)* 22: 127-140.
- Mora, F. and Myers, R.D., 1977, Brain self-stimulation: direct evidence for the involvement of dopamine in the prefrontal cortex, *Science*, 197: 1367-1389.
- Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S. and Bandry, M., 1986, Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5, *Nature*, 319: 774-776.
- Myers, R.D. and Lee, T.F., 1983, In vivo release of dopamine during perfusion of neurotensin in substantia nigra of the unrestrained rat. *Peptides*, 4: 955-961.
- Myers, R.D. and McCaleb, M.L., 1981, Peripheral and intrahypothalamic cholecystokinin act on noradrenergic "feeding circuit" in the rats diencephalon, *Neuroscience* 6: 645-655.
- Nakajima, S., 1984, Serotonergic mediation of habenular self-stimulation in the rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 20: 859-862.
- Nakajima, S. and Baker, J.D., 1989, Effects of D2 dopamine receptor blockade with raclopride on intracranial self-stimulation and food-reinforced operant behaviour, *Psychopharmacology* 89: 330-333.
- Nakajima, S. and McKenzie, G.M., 1986, Reduction of the rearing effect of brain stimulation by a blockade of dopamine D1 receptor with SCH 23390, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 919-923.

#### BIBLIOGRAFIA

- Nassif, S., Cardo, B., Libersat, F. and Velley, L., 1985, Comparison of deficits in electrical self-stimulation after ibotenic acid lesion of the lateral hypothalamus and the medial prefrontal cortex, *Brain Research* 332: 247-257.
- Nazzaro, J.M., Seeger, T.F. and Gardner, E.L., 1981, Morphine differentially effects ventral tegmental and substantia nigra brain reward thresholds. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14: 325-331.
- Nelson, W.T., Steiner, S.S., Brutus, M.M., Farrell, R. and Ellman, S.J., 1981, Brain site variations in effects of morphine on electrical self-stimulation, *Psychopharmacology* 74: 58-65.
- Nemeroff, C.B., 1986, The interaction of neurotensin with dopaminergic pathways in the central nervous system: neurobiology and implications for the pathogenesis and treatment of Schizophrenia, *Psycho-neuroendocrinology*, 11: 15-37.
- Nemeroff, C.B., Bissette, G., Manberg, P.J., Osbahr, A.J., Breese, G.R. and Prange, A.J., 1980, Neurotensin induce hypothermia: evidence for an interaction with dopaminergic systems and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Brain Res.* 195: 69-84.
- Nemeroff, C.B., Bissette, G., Prange, A.F., Jr., Loosen, P.T., Barlow, T.S. and Lipton, M.A., 1977, Neurotensin: central nervous system effects of a hypothalamic peptide, *Brain Res.* 128, 485-596.
- Nemeroff, C.B., Bissette, G., Widerlov, Beckmann, H.H., Gerner, R., Manberg, P.J., Lindstrom, L., Prange, A.J. and Gattaz, W., 1989, Neurotensin-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia, depression, anorexia nervosa-bulimia and premenstrual syndrome, *J. Neuropsychiatr. Clin. Neurosci.* 1: 16-20.
- Nemeroff, C.B. and Cain, S.T., 1985, Neurotensin-dopamine interactions in the CNS, *TIPS* 6, 201-205.
- Nemeroff, C.B., Luttinger, D., Hernández, D.E., Mailman, R.B., Mason, G.A., Davis, S.D., Widerlov, E., Frye, G.D., Kilts, C.D., Beaumont, K., Breese, G.R. and Prange, A.J., Jr., 1983, Interaction of neurotensin with brain dopamine systems: biochemical and behavioral studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 225: 337-345.
- Newman, L.M., 1972, Effects of cholinergic agonists and antagonists on self-stimulation behaviour in the rat, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 79: 394-413.
- Olds, J., 1976, Reward and drive neurons in: *Brain-stimulation reward*, eds. A Wauquier, E.T. Rolls, (North Holland, Amsterdam) pp. 1-27.
- Olds, J. and Milner, P., 1954, Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain, *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 47: 419-427.
- Olds, J. and Olds, M.E., 1965, Drives, rewards, and the brain in: *New Directions in Psychology II*, eds. F. Barron, V.C. Dement. (Holt Rinehart and Winston, New York).



RAIMUNDO SABATER

- Olds, M.E. and Forbes, J.J., 1981, The central basis of motivation: intracranial self-stimulation studies, *Ann. Rev. Psychol.* 32: 523-574.
- Ottersen, O.P. and Storm-Mathisen, J., 1984, Glutamate and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique, *J. Comp. Neurology*, 229: 374-429.
- Palacios, J. M. and Kuhar, M.J., 1981, Neurotensin receptors are found on dopaminergic-containing neurons in the rat brain: an autoradiographic study, *Nature* 294, 587.
- Paxinos, G. and Watson, C., 1986, The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd Edition (Academic Press, New York).
- Penit-Soria, J., Audinat, E. and Crepel, F., 1987, Excitation of rat prefrontal cortical neuron by dopamine: An in vitro electrophysiological study, *Brain Res.* 425: 263-274.
- Phillips, A.G., 1984, Brain reward circuitry: a case for separate systems, *Brain Res. Bull.* 12: 195-201.
- Phillips, A.G., Carter, D.A. and Fibiger, H.C., 1976, Differential effects of parachlorophenylalanine on self-stimulation in caudate putamen and lateral hypothalamus, *Psychopharmacology*, 49: 23-27.
- Phillips, A.G., and Fibiger, H.C., 1978, The role of dopamine in maintaining intracranial self-stimulation in the ventral tegmentum, nucleus accumbens and medial prefrontal cortex, *Can. J. Physiol.* 32, 58.
- Phillips, A.G., Mora, F. and Rolls, E.T., 1979, Intracranial self-stimulation in orbitofrontal cortex and caudate nucleus of rhesus monkey: effects of apomorphine, pimozide and spiroperidol, *Psychopharmacology*, 62: 79-82.
- Porrino, L.J., Espósito, R.U., Seeger, T.F., Grane, A.M., Peut, A. and Sokoloff, L., 1984, Metabolic mapping of the brain during rewarding self-stimulation, *Science*, 224: 306-309.
- Poschel, B.P.H. and Ninteman, F.W., 1971, Intracranial reward and the forebrain's serotonergic mechanism: studies employing parachlorophenylalanine and parachloroamphetamine, *Physiol. Behav.* 7: 39-46.
- Pozza, M.F., Küng, E., Bischoff, S. and Olpe, H.R., 1988, The neurotensin analog xenopsin excites nigral dopamine neurons, *Europ. J. Pharmacol.* 145: 341-343.
- Pradhan, S.N. and Bowling, C., 1971, Effects of nicotine on self-stimulation in rats. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 176: 229-243.
- Quirion, R., Chivels, C.C., Everist, H.D. and Pert, A., 1985, Comparative localization of neurotensin receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic terminals, *Brain Res.* 327: 385-389.

#### BIBLIOGRAFIA

- Quirion, R., Gaudreau, P., Pierre, S., Rioux, F., Pert, C.B., 1982, Autoradiographic distribution of (3H)neurotensin receptors in rat brain: visualization by tritium-sensitive film, *Peptides*, 3: 757-763.
- Radke, J.M., MacLennan, A.J., Beinfield, M.C., Nemeroff, C.B., Vincent, S.R., and Fibiger, H.C., 1999, Effects of short and long-term haloperidol administration and withdrawal on regional brain cholecystikinin and neurotensin concentrations in the rat, *Brain Res.* 480: 178-183.
- Ramirez, M., Alba, F., Vives, F., Mora, F. and Osorio, C., 1983, Monoamines and self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat, *Rev. Esp. Fisiol.* 39: 351-356.
- Ritter, S. and Stein, L., 1973, Self-stimulation of noradrenergic cell group (A 6) in locus coeruleus of rats, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 85: 443-452.
- Roberts, W.W., 1968, Both rewarding and punishing effects from stimulation of posterior hypothalamus of cat with same electrode and same intensity, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 51: 400-407.
- Robertson, A. and Mogenson, G.J., 1979, Facilitation of self-stimulation of the prefrontal cortex in rats following chronic administration of spiroperidol or amphetamine, *Psychopharmacol. (Berlin)*, 65: 149-154.
- Robertson, A., Lafeniere, A. and Milner, P.M., 1986, The role of cortico-cortical projections in self-stimulation of the prelimbic and sulcal prefrontal cortex in rats, *Behav. Brain Res.*, 21: 129-142.
- Roll, S.K., 1970, Intracranial self-stimulation and wakefulness: effects of manipulating ambient catecholamines, *Science*, 168: 1370-1372.
- Rolls, E.T., 1972, Activation of amygdaloid neurones in reward, eating and drinking elicited by electrical stimulation of the brain, *Brain Res.* 45: 365-381.
- Rolls, E.T., 1974, The neuronal basis of brain stimulation reward, *Proc. in Neurobiol.* 3: 71-160.
- Rolls, E.T., 1975, *The Brain and Reward*. Pergamon Press, Oxford.
- Rolls, E.T. and Cooper, S.J., 1973, Activation of neurones in the prefrontal cortex by brain stimulation reward in the rat, *Brain Res.* 60: 351-368.
- Rolls, E.T., Burton, M.J. and Mora, F., 1980, Neurophysiological analysis of brain-stimulation reward in the monkey, *Brain Res.* 194: 339-357.
- Rompré, P., P. Baucó and A. Gratton, 1992, Facilitation of brain stimulation reward by mesencephalic injections of neurotensin (1-13), *Eur. J. Pharmacol.* 211: 295-303.



- Rompré, P.P. and Shizgal, P., 1986, Electrophysiological characteristics of neurone in forebrain regions implicated in self-stimulation of the medial forebrain bundle in the rat, *Brain Res.* 364: 338-349.
- Rompré, P.P. and Wise, R., 1989, Opioid-neuroleptic interaction in brainstem self-stimulation, *Brain Res.* 477: 144-51.
- Routtenberg, A., 1971, Forebrain pathways of reward in *rattus norvegicus*. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 75 : 269-276.
- Routtenberg, A. and Sloan, H., 1972, Self-stimulation in the prefrontal cortex of the *rattus norvegicus*, *Behav. Biol.* 7: 567-572.
- Rowe, W., Viau, V., Meani, M.J. and Quirion, R., 1992, Central administration of neurotensin stimulated hypothalamic-pituitary-adrenal activity: the paraventricular CRF neurons as a critical site of action, in: *The Neurobiology of Neurotensin*, eds. Kitabgi, P. and C.B. Nemeroff, (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 365-367.
- Sakamoto, N., Mitchel, J.P., Kiyama, H., Tohyama, M., Kropp, M. and Pearson, J., 1986, Neurotensin immunoreactivity in the human cingulate gyrus, hippocampal, subiculum and mammillary bodies. its potential role in memory processing, *Brain Res.* 375: 351-356.
- Sakanaka, M., Shiosaka, S., Takatsuki, K. and Tohyama, M., 1983, Evidence for the existence of a substance P-containing pathway from the nucleus laterodorsalis tegmenti (Castaldi) to the medial frontal cortex in the rat, *Brain Res.* 259: 123-126.
- Sarter, M. and Markowitsch, H.J., 1983a, Convergence of basolateral amygdaloid and mediodorsal thalamic projections in different areas of the frontal cortex in the rat, *Brain Res. Bull.* 10: 607-622 .
- Sarter, M. and Markowitsch, H.J., 1983b, Cognitive functions of the basolateral limbic circuit: functional interaction of the basolateral amygdala with prefrontal areas and the mediodorsal thalamic nucleus as studied using different tasks and selective lesions, *Neurosci. Lett.* 14: 5-322.
- Schmitt, P., Abou-Hamed, H y Karli, P., 1977, Effects aversifs et appétitifs induits par stimulation mésencéphalique et hypothalamique, *Brain Res.*, 130: 521-530.
- Schotte, A. and Leysen, J.E., 1989, Autoradiographic evidence for the localization of high affinity neurotensin binding sites on dopaminergic nerve terminals in the nigrostriatal and mesolimbic pathways in the rat brain, *J. Chem. Neuroanatomy* 2: 253-257.
- Schotte, A., Rostene, W. and Laduron P.M., 1988, Different subcellular localization of neurotensin-receptor and neurotensin-acceptor sites in the rat brain dopaminergic system, *J. Neurochem.*, 50 1026-1031.
- Sem-Jacobsen, C.W. and Torkildsen, A., 1960, Depth recording and electrical stimulation in the human brain, In: *Electrical Studies on the Unanesthetized Brain*. eds. E.R. Ramsey y D.S. O'Doherty (Hoeber New York).

#### BIBLIOGRAFIA

- Seutin, V., Massotte, L. and Dresse, A., 1989, Electrophysiological effects of neurotensin on dopaminergic neurones of the ventral tegmental area of the rat in vitro, *Neuropharmacology* 28, 949-954.
- Shaw, S.C., Vives, F. and Mora, F., 1984, Opioid peptides and self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat, *Psycho-pharmacology* 83: 288-292.
- Shelton, R., and Weinberger, D.R., 1987, in *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress* (Meltzer, H., ed.), pp. 773-781, Raven Press.
- Shi, W. and Bunney, B.S., 1991, Effects of neurotensin on midbrain dopamine neuron: Are they mediated by formation of a neurotensin-dopamine complex?, *Synapse*, 9: 79-94.
- Shi, W. and Bunney, B.S., 1992, Actions of neurotensin: A review of the electrophysiological studies, in: *The neurobiology of Neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.B. Nemeroff, (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 129-145.
- Shults, C.W., Quinon, R., Chronwall, B., Chase, T.N. and Odonohue, T.L., 1984, A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system, *Peptides*, 5: 1097-1128.
- Sibley, D.R., Monsma, F.J. and Shen, J., 1993, Molecular Neurobiology of D1 and D2 dopamine receptors, in: *D1:D2 dopamine receptor interactions*, eds. J. Waddington, (Academic Press, London), pp. 1-21.
- Silverman, J.A. and Corbett, D., 1989, Prefrontal cortex lesions attenuate substantia nigra self-stimulation: a reward summation analysis, *Behav. Brain Res.* 32: 43-50.
- Simon, H., Stinus, L., Tassin, J.P., Lavielle, S., Blanc, G., Thierry, A.M., Glowinski, J. and LeMoal, M., 1979, Is the dopaminergic mesocortico-limbic system necessary for intracranial self-stimulation?, *Behav. Neurol. Biol.* 27 : 125-145.
- Snidgers, R., Kramarcy, N.R., Hurd, R.W., Nemeroff, C.B. and Dunn, A.J., 1982, Neurotensin induces catalepsy in mice, *Neuropharmacology*, 21: 465-468.
- Stein, L., 1968, Chemistry reward and punishment. *Psychopharmacology: A Review of Progress, 1957-1967*. D Efron (Eds.), PHS Publi., n° 1836, Washinton DC, GPO: 105-123.
- Stellar, J.R. and Corbett, D., 1989, Regional neuroleptic microinjections indicate a role for nucleus accumbens in lateral hypothalamic self-stimulation reward. *Brain Res.* 477: 126-143.
- Stephens, D.N. and Herberg, J., 1979, Dopamine-acetylcholine "balance" in nucleus accumbens and corpus striatum and its effects on hypothalamic self-stimulation, *Eur. J. Pharmacol.* 54: 331- 339.
- Stowe, Z.N., Bissette, F. and Nemeroff, C.B., 1991, Neurotensin-dopamine interactions: relevance to schizophrenia and the action of antipsychotic drugs, *Jap. J. Pharmacol.*, 11: 343-356.



- Studler, J.M., Kitabgi, P., Tramu, G., Hervé, D., Glowinski J. and Tassin, J.P., 1988, Extensive colocalization of NT with DA in rat meso-cortical-frontal dopaminergic neurons, *Neuropeptides*, 11: 95-100.
- Takeichi, T., Kurumiya, S., Unemoto, M. and Olds, M.E., 1986, Roles of catecholamine terminals and intrinsic neurons of the ventral tegmentum in self-stimulation investigated in neonatally dopamine-depleted rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1101-1109.
- Tamminga, C.A. and Gerlach, J., 1987, New neuroleptic and experimental antipsychotics in schizophrenics. In: eds. H.Y. Meltzer, *The Third Generation of Progress, Psychopharmacology*, Raven Press, New York, pp. 1129-1140.
- Tanaka, K., Masu, M. and Nakanishi, S., 1990, Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor, *Neuron*, 4: 847-854.
- Tanganelli, S., G. Von Euler, K. Fuxe, L.F. Agnati and U. Ungerstedt, 1989, Neurotensin counteracts apomorphine-induced inhibition of dopamine release as studied by microdialysis in rat neostriatum, *Brain Res.* 502: 319-324.
- Tassin, J.P., Kitabgi, P., Tramu, G., Herve, D. and Glowinski, J., 1988, Rat mesocortical dopaminergic neurons are mixed neurotensin dopamine neurons: immunohistochemical and biochemical evidence, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 537: 531-533.
- Tassin, J.P., Trovero, F., Hervé, D., Blanc, G. and Glowinski, J., 1992, Mesocortical dopamine-neurotensin neurons, in: *The Neurobiology of neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.B. Nemeroff, (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 205-216
- Thierry, A.M., Tassin, J.P., Blanc, G. and Glowinski, J., 1976, Topographic and pharmacological study of the mesocortical dopaminergic system, in: *Brain-Stimulation Reward*, eds. A. Wauquier, E. Rolls, (North Holland, Amsterdam) 290-293.
- Uhl, G.R. and Snyder, S., 1977, Regional and subcellular distribution of brain neurotensin, *Life Sci.* 19: 1827-1832.
- Uhl, G.R., Whitehouse, P.J., Price, D.L., Tourtelotte, W.W. and Kuhar, M.J., 1984, Parkinson's disease: depletion of substantia nigra neurotensin receptors, *Brain Res.* 308: 186-194
- Unemoto, M., Takeichi, T., Kurumiya, S. and Olds, 1984, Selective neonatal depletion of dopamine has no effects on medial prefrontal cortex self-stimulation in the rat, *Neurosci. Res.* 1: 295-307.
- Ungerstedt, U., 1971, Stereotypic mapping of the monoamine pathways in the rat, *Acta Physiol. Scand.*, 367: 1-122.
- Van Der Kooy, D., Le Piane, F.G. and Phillips, A.G., 1977, Apparent independence of opiate reinforcement and electrical self-stimulation systems in rat brain, *Life Science* 20: 981-986.

#### BIBLIOGRAFIA

- Velley, L., 1985, Unilateral lesion of the intrinsic cells in the medial forebrain bundle depresses self-stimulation but not stimulus-bound locomotor activity, *Neurosci. Lett.* 57: 199-204.
- Velley, L., Chaminade, C., Roy, M.T., Kempt, E. and Cardo, B., 1983, Intrinsic neurons are involved in lateral hypothalamic self-stimulation, *Brain Res.* 268:79-86.
- Vicent, J.P., 1992, Neurotensin receptors. Binding properties, transduction, mechanism, and purification, in: *The Neurobiology of Neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.B. Nemeroff, (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 90-100.
- Vives, F. and Mora, F., 1986, Effects of agonists and antagonists of cholinergic receptors on self-stimulation of the medial prefrontal cortex of the rat, *Gen. Pharmac.* 17. 63-67.
- Vives, F., Gayoso, M.J., Osorio, C. and Mora, F., 1983, Afferent pathways to points of self-stimulation in the medial prefrontal cortex of the rat as revealed by the horseradish peroxidase technique, *Behav. Brain Res.* 8: 23-32.
- Vives, F., Morales, A. and Mora, F., 1986, Lesiones of connections of the medial prefrontal cortex in rats: Differential effects on self-stimulation and spontaneous motor activity, *Physiol. Behav.* 36. 47-52.
- Waraczynski, M.A., 1988, Basal forebrain knife cuts and medial forebrain bundle self-stimulation, *Brain Res.* 438: 8-22.
- Weinberger, D.R., 1988, Schizophrenia and the frontal lobe. *TINS* 11: 367-370.
- Widerlov, E., Kilts, C.D., Mailman, R.B., Nemeroff, C.B., McCowen, T.J., Prange, A.F., Jr. and Breese, G.R., 1982a, Increase in dopamine metabolites in rat brain by neurotensin, *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 223: 1-6.
- Widerlov, E., Lindstrom, L.H., Besev, G., Manberg, P.J., Nemeroff, G.B., Bresse, G.R., Kizer, F.S. and Prange, A.J., 1982b, Subnormal CSF levels of neurotensin in a subgroup of schizophrenic patients: Normalization after neuroleptic treatment, *Am. J. Psychiatry* 139: 1122-1126.
- Wise, C.D., Berger, B.D. and Stein, L., 1973, Evidence of alfa-noradrenergic reward receptors and serotonergic punishment receptors in the rat brain, *Biol. Psychiat.* 6: 3-21.
- Wise, R.A. and Stein, L., 1969, Facilitation of brain self-stimulation by central administration of norepinephrine, *Science*, 163: 299-301.
- Wishart and Herberg, 1979, Central cholinergic mechanisms in electrical self-stimulation and in drug-induced tremor in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11: 625-629.
- Witte, PH., Heidbreder, Ch. and Gewiss, M., 1992, Enhancement of mesolimbic rewarding brain stimulation by neurotensin injected into the accumbens, the subiculum, or the ventral tegmental area, in: *The Neurobiology of Neurotensin*, eds. P. Kitabgi and C.B. Nemeroff, (Annals of the New York Academy of Sciences), pp. 335-338.



RAIMUNDO SABATER

Wurtz, R.H. and Olds, J., 1963, Amygdaloid stimulation and operant reinforcement in the rat, *J. Comp. Physiol Psychol.* 56: 941-949.

Yadin, E., Guarini, V. and Gallistel, C.R., 1983, Unilaterally activated systems in rats self-stimulating at sites in the medial forebrain bundle, medial prefrontal cortex or locus coeruleus, *Brain Res.* 266: 39-50.

Young, W.S., III and Kuhar, M.J., 1981, Neurotensin receptor localization by light microscopic autoradiography in rat brain, *Brain Res.* 220: 273-285.