



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11281  
6  
2e)

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"PAPEL DEL SISTEMA SEROTONINERGICO ESTRIATAL EN  
PROCESOS DE RETENCION DE LA CONDUCTA DE PREVENCION PASIVA"

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(AREA DE FISILOGIA)

P R E S E N T A

RAFAEL SOLANA FIGUEROA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO A. PRADO ALCALA

SINODALES: DR. LEON CINTRA MCGLONE  
DR. HUGO SOLIS ORTIZ  
DRA. ELVIRA GALARRAGA  
DR. MANUEL SALAS  
DR. MIGUEL PEREZ DE LA MORA  
DR. HUMBERTO NICOLINI  
DR. ROBERTO A. PRADO ALCALA

MEXICO, D.F.

**FALLA DE ORIGEN**

1995

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Alca facta art.  
(la suerte está echada)  
"no hay marcha atrás".*

DEDICATORIA

A todos los que directa o indirectamente (buenos o malos), existencialmente han tenido que ver algo en mi vida, de todos he aprendido algo: GRACIAS.

A: Alma, Ingrid y Duni:  
Una fuerte razón para existir  
y amar.



*Y, siguiendo con los agradecimientos:*

*Por razones objetivas y transferenciales a:*

*Jorge Bouton, Médico Internista Uruguayo de quien aprendí el sen  
tido del compromiso en la Medicina,*

*Aniceto Aramoni, Psicoanalista humanista en especie de extinción,  
su trabajo anónimo y su genialidad me ha permitido fortalecer mi  
creencia en el ser humano en esta sociedad caótica e incierta.*

*Roberto Prado Alcalá, una de sus principales virtudes, es el  
ejercicio de la libertad y el rigor científico, aprendí mucho de  
su silencio.*

*A mis padres y hermanos.*

*A los compañeros de laboratorio, sin excepción.*

*A los amigos cercanos y lejanos en especial a Mónica Barón y Erasmo.*

*Y por que no, también a las Instituciones:*

*A la UNIVERSIDAD AUTONOMA "BENITO JUAREZ" DE OAXACA, por su permanente  
apoyo.*

*Al CONACYT, por apoyarme con una beca.*

*Al Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM.*

*Y ahora a un ser humano: Al Sr. Joaquín Mendoza por su ayuda técnica.*

**GRACIAS A TODOS.**

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>INTRODUCCION</b>	5
<b>I. BASES BIOQUIMICAS Y NEUROFARMACOLOGICAS DE LA SEROTONINA</b>	11
1.1 Biosíntesis de la serotonina	11
1.2 Antecedentes históricos de la participación de la serotonina en la conducta y desordenes mentales	23
<b>II. EL SISTEMA SEROTONINERGICO ESTRIATAL</b>	26
2.1 Estriado y serotonina	29
2.1.1 Receptores a serotonina y mecanismos de control	31
2.1.2 Estriado y subtipos de receptores	36
2.1.3 Estriado y receptores 5-HT <sub>2</sub>	37
2.1.4 Otros receptores en el estriado	40
<b>III. SEROTONINA, VIAS NEUROTRANSMISORAS Y REGULACION SEROTONINERGICA EN EL ESTRIADO</b>	42
3.1 Serotonina	42
3.2 Distribución y función de las vias serotoninérgicas en el estriado	49
3.3 Regulación y autorregulación de la vía serotoninérgica en el estriado	62
3.4 Integración funcional	90
<b>IV. ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LA HIPOTESIS</b>	96
4.1 Participación colinérgica del estriado en procesos de memoria	96
4.2 Participación serotoninérgica del estriado en procesos de memoria	101
<b>V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LA HIPOTESIS DE TRABAJO DEL EXPERIMENTO I y II</b>	139
5.1 Hipótesis del experimento I	141
5.2 Métodos en el experimento I	141
5.3 Aparatos	141
5.4 Procedimiento de condicionamiento	142
5.5 Tratamientos para el experimento I	143
5.6 Estadística empleada	145
5.7 Resultados del experimento I	145

5.8 Hipótesis del experimento II	150
5.9 Métodos en el experimento II	150
5.10 Cirugía en el experimento II	150
5.11 Procedimiento de microinyección	151
5.12 Tratamientos en el experimento II	152
5.13 Histología del experimento II	153
5.14 Estadística	153
5.15 Resultados del experimento II	153
5.16 Discusión del experimento I y II	156
<b>VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LA HIPOTESIS DE TRABAJO DEL EXPERIMENTO III</b>	<b>160</b>
6.1 Hipótesis del experimento III	163
6.2 tratamientos	163
6.3 Resultados del experimento III	165
6.4 Discusión del experimento III	170
6.5 Conclusiones finales	176
<b>VII. REFERENCIAS</b>	<b>178</b>
 <b>APENDICE</b>	
Artículo publicado	217

## RESUMEN

Existe una gran cantidad de datos que indican que tanto el sistema colinérgico como el GABAérgico están involucrados en la consolidación de la memoria. Por otra parte, la participación del sistema serotoninérgico (que está funcionalmente relacionado con los anteriores) en procesos mnémicos no es clara, aunque hay reportes experimentales que señalan que la administración de la p-cloroanfetamina (PCA) produce alteraciones en el aprendizaje y la memoria. La PCA agota la serotonina que se encuentra almacenada en las terminaciones nerviosas del sistema nervioso central. También, los efectos de una gran variedad de agonistas y antagonistas serotoninérgicos en diferentes tareas de aprendizaje y memoria han sido estudiados. Los resultados han sido contradictorios e inconsistentes.

El propósito de esta tesis fue determinar: 1. Si la interferencia con la actividad serotoninérgica a través de aplicaciones de PCA i.p., produce déficits en la memoria y si hay alguna interacción entre diferentes niveles de reforzamiento y los efectos de la PCA sobre la memoria; 2. Si la aplicación intraestriatal de la PCA produce déficits en la memoria de largo plazo; 3. Si los receptores a serotonina 5-HT<sub>2</sub> en el estriado juegan algún papel importante en la consolidación de la memoria.

Los experimentos presentados en esta tesis fueron realizados en ratas, entrenadas en una tarea de prevención pasiva de un sólo ensayo. La retención de la tarea fue medida 24 horas más tarde (memoria de largo plazo).

En el experimento 1, las intensidades de choque eléctrico que se aplicaron durante el entrenamiento fueron de: 2.5, 2.6, 3.0, 4.0 u 8.0 mA. Para cada intensidad hay tres grupos de animales: intactos, inyectados i.p., con solución salina o con PCA (2.5 mg/kg). Grupos adicionales entrenados con 2.5 mA, fueron tratados con 1.25 ó 1.875 mg/kg de PCA. Las inyecciones fueron aplicadas 30 minutos antes del entrenamiento como 30 minutos antes de la prueba de retención. Los grupos que fueron entrenados con 2.5 y 8.0 mA recibieron un tratamiento de 2.5 mg/kg de PCA un minuto después del entrenamiento. Los resultados muestran que la PCA produce un efecto amnésico el cual fue dosis-dependiente, y que altas intensidades del choque eléctrico (4.0 y 8.0 mA) previenen el efecto amnésico de la PCA.

En el caso de las inyecciones intraestriatales (experimento 2), las ratas fueron entrenadas con 4 mA; grupos independientes fueron inyectados 5 minutos antes del entrenamiento, con solución salina o con 5 ug de PCA a 30, 15 ó 5 minutos antes del entrenamiento; otro grupo fue inyectado con la misma dosis, y la droga se aplicó 5 minutos antes del entrenamiento y 5 minutos antes de la prueba de la retención. Encontramos que hubo un efecto amnésico tiempo-dependiente, por ejemplo, como el intervalo entre el tratamiento y el entrenamiento se fue acortando produciéndose un mayor efecto amnésico por la PCA.

En el tercer experimento, grupos independientes fueron inyectados intraestriatalmente con mianserina (0.025, 0.05, 0.02, 0.08, 3.0 ó 6.0 ug/ul en un minuto) o ketanserina (0.0005, 0.001, 0.002, 0.004, 0.04 ó 1.4 ug/ul en un minuto). Un grupo control fue inyectado con 0.8 ug de mianserina combinado con 0.04 ug de ketanserina disueltos

en 1 ul de solución salina isotónica. Todas las inyecciones fueron hechas de 1.5-2.0 minutos después del entrenamiento. El análisis estadístico mostró que la mianserina no tuvo efecto amnésico sobre la consolidación de la memoria, mientras que la ketanserina produjo amnesia a una dosis tan baja como 0,004 ug/ul.

Estos resultados permiten establecer las siguientes conclusiones: 1. La serotonina esta críticamente involucrada en la consolidación de la memoria de una tarea de prevención pasiva; 2. Dado que los déficits en la memoria producidos por la PCA son similares a aquellos observados después del bloqueo colinérgico y puesto que la acetilcolina y la serotonina estan funcionalmente relacionadas, estos sistemas neuroquímicos pueden interactuar uno con el otro en el establecimiento de la consolidación de la memoria; 3. La serotonina estriatal esta importantemente involucrada en funciones cognitivas; 4. La serotonina no es necesaria para la consolidación de la memoria de la prevención pasiva cuando en el entrenamiento se aplican altas intensidades de choque eléctrico; 5. Los receptores a serotonina del tipo 5-HT<sub>2</sub> juegan un papel importante en la consolidación de la memoria, probablemente a través de su interacción con receptores colinérgicos.

## ABSTRACT

3

There is a wealth of information which indicates that both the cholinergic and GABAergic systems are involved in memory consolidation. On the other hand, the participation of the serotonergic system (which is functionally related to the cholinergic and GABAergic systems) in memory processes is far from clear, although there are some data that administration of p-chloramphetamine (PCA) produces disturbances in learning and memory. PCA depletes serotonin stores of nerve terminals in the central nervous system. The effects of a wide variety of serotonin agonists and antagonists on different learning tasks have been studied. The results have been contradictory and inconsistent.

The aim of this thesis was to determine: 1. Whether the interference with serotonergic activity, induced by ip injections of PCA, produces memory deficits, and whether there is an interaction between different levels of reinforcement and the effects of PCA on memory; 2. Whether intrastriatal infusion of PCA produces deficits in long-term memory; 3. Whether striatal 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptors play a relevant role in memory consolidation.

The experiments presented in this thesis were conducted in rats, trained in a one-trial passive avoidance task. Retention of the task was measured 24 h later (long-term memory).

In Experiment 1, the following footshock intensities were used during training: 2.5, 2.6, 3.0, 4.0 and 8.0 mA. For each intensity there were three groups of animals: intact, injected ip with saline solution or with PCA (2.5 mg/kg). Additional groups, trained with 2.5 mA, were treated with 1.25 or 1.875 mg/kg of PCA. The injections were administered 30 min before training. Another group was injected with 2.5 mg/kg of PCA both 30 min before training and 30 min before retention testing. The groups that had been trained with 2.5 and 8.0 mA were treated with 2.5 mg/kg of PCA one min after training. The results showed that PCA produced an amnesic effect which was dose-dependent, and that the higher levels of footshock (4.0 and 8.0 mA) prevented the amnesic effect of PCA.

In the case of intrastriatal injections (Experiment 2), rats were trained with 4.0 mA; independent groups were infused, 5 min before training, with isotonic saline, or with 5  $\mu$ g of PCA at 30, 15 or 5 min before training; another group was injected with the same dose and drug at both 5 min before training and at 5 min before retention testing. It was found that there was a time-dependent amnesic effect, i.e., as the interval between treatment and training was shorter, the greater was the amnesia produced by PCA.

In the third experimental series, independent groups were submitted to intrastriatal infusions of mianserine (0.025, 0.05, 0.02, 0.08, 3.0 or 6.0  $\mu$ g/ $\mu$ l in 1 min) or ketanserine (0.0005, 0.001, 0.002, 0.004, 0.04 or 1.4  $\mu$ g/ $\mu$ l in 1 min). A control group was injected with 0.8  $\mu$ g of mianserine combined with 0.04  $\mu$ g of ketanserine dissolved in 1  $\mu$ l of isotonic saline. All infusions were made 1.5-2.0 min after training. The statistical analyses showed that mianserine had no effect on memory consolidation,

while ketanserine produced amnesia, with doses as low as 0.004  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

These results lead to the following conclusions: 1. Serotonin is critically involved in memory consolidation of passive avoidance; 2. Since the memory deficits produced by PCA are similar to those observed after cholinergic blockade, and since acetylcholine and serotonin are functionally related, these two neurochemical systems may interact with each other in the establishment of memory consolidation; 3. Striatal serotonin is importantly involved in cognitive functions; 4. Serotonin is not necessary for memory consolidation of passive avoidance trained with relatively high levels of footshock; 5. Striatal serotonin receptors of the 5-HT<sub>2</sub> type play an important role in memory consolidation, probably through their interaction with cholinergic receptors.

## INTRODUCCION

Una de las funciones en los seres vivos que le ha permitido sobrevivir a las condiciones cambiantes del medio ambiente, es sin lugar a dudas, la memoria. El hombre, especie biológica altamente evolucionada en toda su historia natural: conoció, aprendió, almacenó información y transformó el medio que lo rodea. Toda la información adquirida como parte de su existencia en este planeta la ha heredado a las nuevas generaciones, para que estas, nuevamente; registren, almacenen y transmitan lo que se ha conocido a las generaciones del futuro en un espiral dialéctico de evolución y conocimiento. Para que esto pudiera realizarse fue necesario que existiera una nueva forma de organización biológica altamente evolucionada conocida como cerebro, se trata de una síntesis universal de todo lo existente: componentes químicos, células, átomos, moléculas, receptores, mensajeros, redes altamente sofisticadas, pensamientos, ideas, recuerdos, pasiones, etc.

John, (1977) comenta: "El cerebro es un mecanismo maravilloso. Nuestros amores y nuestros odios, lo que creemos bueno o malo, nuestros juicios sobre la belleza y la fealdad del mundo que nos rodea, los valores a los que aspiramos, las injusticias que tratamos de enmendar, todas estas riquezas mentales que forman la parte más apreciada de la vida se producen de alguna manera por la interacción de las experiencias presentes con los residuos de nuestro pasado previamente almacenado en el cerebro. Sin aprendizaje el niño no podría convertirse en hombre. El aprendizaje no se concibe sin procesos de almacenamiento de información y, lo que quizás sea más notable aún, sin la recuperación deliberada y el recuerdo consciente de la experiencia pasada". Cualquier acción humana tiene que ver con lo que se aprende y almacena, si estas funciones se pierden, el ser humano está condenado a morir y la especie como tal no podría resistir a tales pérdidas.

Prado-Alcalá, (1993) hace la siguiente reflexión: "Uno de los objetivos de las neurociencias conductuales es determinar las bases biológicas de la memoria, considerándola como un proceso que probablemente tenga los mismos fundamentos a lo largo de toda la escala filogenética".

Es por ello, particularmente mi interés de tratar de comprender estas bases biológicas estudiando los mecanismos neurofisiológicos que



ocurren en el cerebro de las ratas, en virtud de que las estructuras que participan en estas funciones son las mismas que las que tiene el cerebro humano.

Sin embargo aunque lo anterior se presenta, el fenómeno es más complejo de lo que superficialmente se nos presenta como una primera aproximación. Hay que recordar que el sistema nervioso humano funciona con miles de millones de neuronas en extensas y complicadas redes en donde se presenta una convergencia general entre lo que llega al cerebro por los sentidos y lo que de él sale por eferencias motoras, o lo que se elabora como pensamientos, además de una capacidad para la toma de decisiones en fracciones de segundos.

Antes de detallar los elementos que forman el núcleo central de la estructura de la tesis, comentaré con brevedad, por razones de espacio, las consideraciones teóricas más importantes que existen respecto a la neurofisiología de la memoria y en las que se fundamenta principalmente este trabajo de investigación.

John, (1977) considera que los mecanismos de almacenamiento y recuperación de información temporales, de consolidación, almacenamiento y recuperación de información de largo plazo resultan difíciles de ser separados experimentalmente aunque en términos lógicos sean fáciles de distinguir. El recuerdo de la experiencia pasada puede ser mediado de modo diferente antes y después de la consolidación. Los mecanismos que intervienen en la recuperación y en la "lectura" de la misma pueden abarcar toda una multiplicidad de estructuras anatómicas y diferir de una tarea a otra, así como entre etapas diferentes de aprendizaje.

Estas consideraciones destacan la prudencia que es menester mostrar para interpretar los resultados experimentales de este dominio, e indican posibles explicaciones de la obvia falta de solidez y la contradicción que existe entre muchos informes; sin embargo, las aparentes contradicciones y debilidades de los datos citados, sirven también para sugerir que no hay ningún lugar anatómico y singular del que dependa definitivamente la consolidación. Parecen estar envueltos muchos lugares que varían de acuerdo con las caracte

...terísticas sensoriales y motivacionales del procedimiento de prueba utilizado; esto es, del contenido de la información por ser almacenada.

Actualmente se ha generalizado la utilización del término engrama, que se define como el conjunto de cambios en el sistema nervioso que representan a la memoria almacenada (Squire, 1987). Existe una gran cantidad de datos experimentales que tratan de mostrar evidencias que justifiquen que el almacenamiento se deba a: cambios bioquímicos, fisiológicos o anatómicos, sin que hasta la fecha existan evidencias sólidas para justificar cualquiera de los cambios antes mencionados como el más importante para que se establezca dicho engrama. Esto es debido a que en términos generales, lo que se observa es una incidencia en lo bioquímico, anatómico y en lo fisiológico. En cuanto a las regiones cerebrales en donde posiblemente radica la memoria, existen dos corrientes que parecen ser excluyentes: la localizacionista, que postula que el engrama se encuentra en áreas discretas e invariantes del cerebro, y aquella que sostiene que la memoria está distribuida en sistemas de estructuras (Quirarte, 1995)

Prado-Alcalá y col. han seguido una línea de investigación en donde los resultados que se fueron acumulando a lo largo de más de 20 años de investigación les permite postular una interesante consideración teórica: proponen que la actividad colinérgica estriatal es indispensable para la adquisición de respuestas condicionadas en las que el número de ensayos o sesiones de entrenamiento sea suficiente para que se logre una ejecución asintótica, así como para aquellas tareas en las que se aplican estímulos nociceptivos de intensidad suficiente para que los animales aprendan a evitarlos. En estas situaciones, la actividad de otras estructuras cerebrales también es esencial para el establecimiento de la memoria (entre ellas, el hipocampo, la amígdala y la sustancia nigra). En otras palabras, estas estructuras estarían conectadas en serie, de tal manera que la lesión o cualquier otro tipo de manipulación que interfiera con el funcionamiento normal de cualquiera de ellas, tendrá como consecuencia la incapacidad para el establecimiento permanente de la memoria.

En la medida en que la experiencia de un aprendizaje particular se repite (sobrentrenamiento), o cuando la intensidad de los estímulos adversivos que se aplican durante aprendizajes del tipo de la prevención pasiva se incrementa (sobrerreforzamiento), entonces las mismas estructuras (y probablemente algunas otras estructuras) también participan en la consolidación de la memoria. Sin embargo, en estas circunstancias ninguna de ellas es esencial para que se presente el fenómeno mnémico, ya que la activación de sólo alguna de ellas será suficiente. En otras palabras, cuando un sujeto es sometido a una experiencia incrementada de aprendizaje las estructuras involucradas sufren un rearrreglo funcional, comportándose como si estuviesen conectadas en paralelo. Así a pesar de que alguna o algunas de esas regiones cerebrales no tenga una actividad normal, la información derivada de la experiencia de aprendizaje podrá llegar a las otras estructuras, las cuales se encargarán de que los procesos mnémicos correspondientes se lleven a cabo (citado en Quirarte, 1995).

A esta brillante tesis, sólo me gustaría agregar el siguiente comentario: Para que este fenómeno se presente el papel que juegan los sistemas neurotransmisores y los receptores en diferentes estructuras cerebrales desde el punto de vista fisiológico, es de suma importancia en relación a los mecanismos de regulación de las funciones que tienen asignadas cada una de las estructuras que participan en los mecanismos de la memoria. El funcionamiento en serie o en paralelo está dado por receptores, vías y neurotransmisores, una aproximación objetiva a este fenómeno será en la medida de saber como se interrelacionan y funcionan tales elementos. Por ello, precisamente en la investigación que realicé tanto en el terreno documental como en los resultados experimentales, se observa que la neurotransmisión serotoninérgica es de gran importancia para estos fenómenos, y lo mismo sucede en relación a otros sistemas neurotransmisores y al papel que juegan los receptores en las diferentes estructuras cerebrales.

### **ESTRUCTURA DE LA TESIS;**

*La metodología que seguí en la elaboración fue la siguiente:*

- a) una parte teórica de revisión ampliamente documentada,*
- b) antecedentes relevantes para la formulación de las hipótesis,*
- c) descripción de los experimentos, resultados y discusión,*
- d) conclusiones y nuevas formulaciones hipotéticas,*

*Inicié con una descripción de la biosíntesis de la serotonina, en virtud de ser ésta la molécula funcional que interactúa en los procesos estudiados y que sin un conocimiento previo de la misma, sería imposible entender el funcionamiento general y su relación con procesos cognitivos, destacando el control de la síntesis y metabolismo, así como su ubicación y función en el estriado. Una vez conocida en toda su amplitud conceptual y experimental a la serotonina, se estudian los antecedentes históricos de la participación de la serotonina en la conducta y desordenes mentales; siempre es necesario ver que evolución y que tanto los conocimientos han soportado la prueba del tiempo en relación a las tesis que existen sobre esta molécula singular.*

*El siguiente paso metodológico, que corresponde al capítulo II, fue la revisión sistemática de todo lo concerniente al sistema serotoninérgico estriatal: aquí el estudio es en términos integrativos ampliamente documentados, se utilizan ejemplos que ilustran los resultados experimentales citados. En este apartado, se destaca el tipo de receptores en el estriado que están involucrados en nuestro objeto de investigación (receptores 5-HT<sub>2</sub>).*

*En el capítulo III, tomando en cuenta los elementos previos, se habla funcionalmente con una visión totalizadora de la interacción de la serotonina, vías neurotransmisoras y la regulación serotoninérgica en el estriado, se da una amplia revisión bibliográfica y se fundamentan las tesis conceptuales, se termina el capítulo con una integración funcional, en la que se resume la participación serotoninérgica en el estriado y sus relaciones funcionales con otros sistemas neurotransmisores.*

*En el capítulo IV, se inicia la parte experimental de la investigación con una amplia fundamentación para la postulación de las hipótesis; por ello, se dan todos los datos documentados respecto a la participación colinérgica y serotoninérgica en el estriado en*

relación a procesos de aprendizaje y memoria, asimismo como estudios post-mortem de pacientes que cursaron con trastornos neurodegenerativos y que involucraron la vía serotoninérgica, o por otra parte los resultados de estudios funcionales en los que se encontraba afectada la vía serotoninérgica per se, o involucrando al sistema colinérgico o a otros sistemas neurotransmisores a nivel estriatal. Se citan todos los datos relacionados con estudios conductuales, dándoles mayor importancia a aquellos en donde se utilizó el paradigma de prevención pasiva y la relación con la vía serotoninérgica.

Fundamentados y comentados estos resultados experimentales y la relación que guardan con nuestra investigación, se pasa a la sección experimental en la que se incluye:

- a) Planteamiento del problema y antecedentes relevantes para la hipótesis de cada uno de los experimentos realizados.
- b) Las hipótesis.
- c) El método.
- d) Aparatos y técnicas (procedimientos).
- e) Tratamientos, histología y estadística empleada.
- f) Resultados con sus respectivas gráficas.
- g) La discusión.
- h) Las conclusiones finales.
- i) Nuevas formulaciones hipotéticas.
- j) Referencias.
- k) Artículo ya publicado.

## CAPITULO I

## BASES BIOQUIMICAS Y NEUROFARMACOLOGICAS DE LA SEROTONINA

De todos los neurotransmisores que existen en el organismo humano, la serotonina es sin lugar a dudas, uno de los más importantes, y que con mayor frecuencia se le encuentra en diferentes partes, desempeñando en gran medida funciones de control. La serotonina, juega un papel fundamental en la neurofarmacología. En virtud de que el presente trabajo trata fundamentalmente de una investigación en donde se abordan sucesos que se manifiestan en el Sistema Nervioso Central (SNC), los aspectos que a continuación se tratan, se refieren a lo que ocurre en las células cerebrales.

## BIOSINTESIS DE LA SEROTONINA.

Para las células cerebrales, el primer paso importante es la captación del aminoácido triptófano, que es el substrato primario para la síntesis. El triptófano del plasma procede primariamente de la dieta, la carencia del triptófano en la alimentación, puede disminuir bastante las concentraciones de serotonina cerebral. Además, se sabe que un proceso activo de captación, facilita la entrada de triptofano en las células, este proceso de entrada está abierto competitivamente por otros aminoácidos, como la fenilalanina. Debido a que el triptófano plasmático tiene una variación rítmica diaria en su concentración, es probable que dicha concentración variable pueda influir profundamente la tasa de síntesis de la serotonina cerebral (Cooper y col., 1984).

El siguiente paso en la vía sintética es la hidroxilación del triptófano en la posición 5 (fig. 1) para formar 5-hidroxitriptófano (5-HTP), este paso suele conocerse como el del grado limitante de la síntesis de serotonina (Jéquier y col., 1967). La enzima responsable de esta reacción, la triptófano-hidroxilasa (Grahame-Smith, 1964; ver Lovenberg, 1973), se encuentra en bajas concentraciones en la mayor parte de los tejidos, incluyendo al cerebro (Cooper y col., 1984). Al parecer, la triptófano-hidroxilasa es una enzima citoplásmica soluble; quienes han examinado la distribución relativa de la triptófano-hidroxilasa tanto en partículas como soluble, han publicado que la enzima en partículas puede asociarse con sinapsis que contienen serotonina, en tanto que la soluble es posible que esté asociada con el citoplasma perinuclear (Cooper y col., 1984). Este paso en la síntesis puede ser específicamente bloqueado por la p-clorofenilalanina (PCPA), resultando una disminución de los niveles de la serotonina cerebral (Koe y Weissman, 1966; Booth y col., 1979). La PCPA compite directamente con el triptófano y también se une irreversiblemente a la enzima. Por lo tanto, la recuperación de la inhibición por triptófano-hidroxilasa con PCPA parece requerir de la síntesis de nuevas moléculas de enzima. En las ratas, una inyección intraperitoneal de 300 mg/kg de este inhibidor, baja la concentración cerebral de serotonina a menos de 20% en tres días, y la recuperación completa sólo se manifiesta después de dos semanas (Cooper y col., 1984).

#### Descarboxilación:

Una vez sintetizado el 5-HTP, es casi inmediatamente descarboxilado a serotonina por la enzima aromática L-aminoácido-descarboxilasa (Udenfriend y col., 1973). Este paso puede ser bloqueado por

diferentes compuestos, incluyendo benzerazide (Burkard y col., 1962) y NSD-1015 (Carlsson, 1964). La acumulación de 5-HTP seguido a la inhibición de la descarboxilasa cerebral ha sido utilizado para estimar el grado de hidroxilación del triptófano (Carlsson y col., 1972). Una vez que se ha formado la serotonina esta puede ser transportada: o a gránulos de almacenamiento o a su degradación via la enzima monoamino oxidasa (MAO) mitocondrial y transportarse fuera de las células como el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Blaschko y Levine, 1966). La recaptura dentro de los gránulos de almacenamiento es esencial para la liberación inducida por el impulso nervioso de la transmisión en la hendidura sináptica (Bloom, 1985). La liberación de la serotonina dentro de la sinapsis estimula receptores postsinápticos 5-HT e inhibe presinápticamente autorreceptores regulando la síntesis y liberación de 5-HT. La serotonina es removida desde la hendidura sináptica por una activa "re-recaptura" neuronal (Anden y col., 1969 ; Carlsson, 1970; Iversen, 1970), y el compuesto es metabolizado por la MAO, como se describió arriba. La MAO se ha encontrado en dos formas que han sido llamadas MAO-A y MAO-B, siendo la serotonina el sustrato preferido por la MAO-A en el cerebro de la rata (Fowler y Ross, 1984).

#### Control de la síntesis y catabolismo de la serotonina:

A primera vista, parece claro que la enzima triptófano-hidroxilasa es la enzima que limita la tasa en la síntesis de serotonina, ya que cuando esta enzima es inhibida en un 80%, el contenido de serotonina en el cerebro disminuye rápidamente. Por otra parte, cuando la enzima L-aminoácido-descarboxilasa es inhibida en iguales o mayores cantidades, no hay un efecto sobre el nivel cerebral de 5-HT (Cooper y col., 1984). Estos datos solamente pueden ser explicados si el paso importan



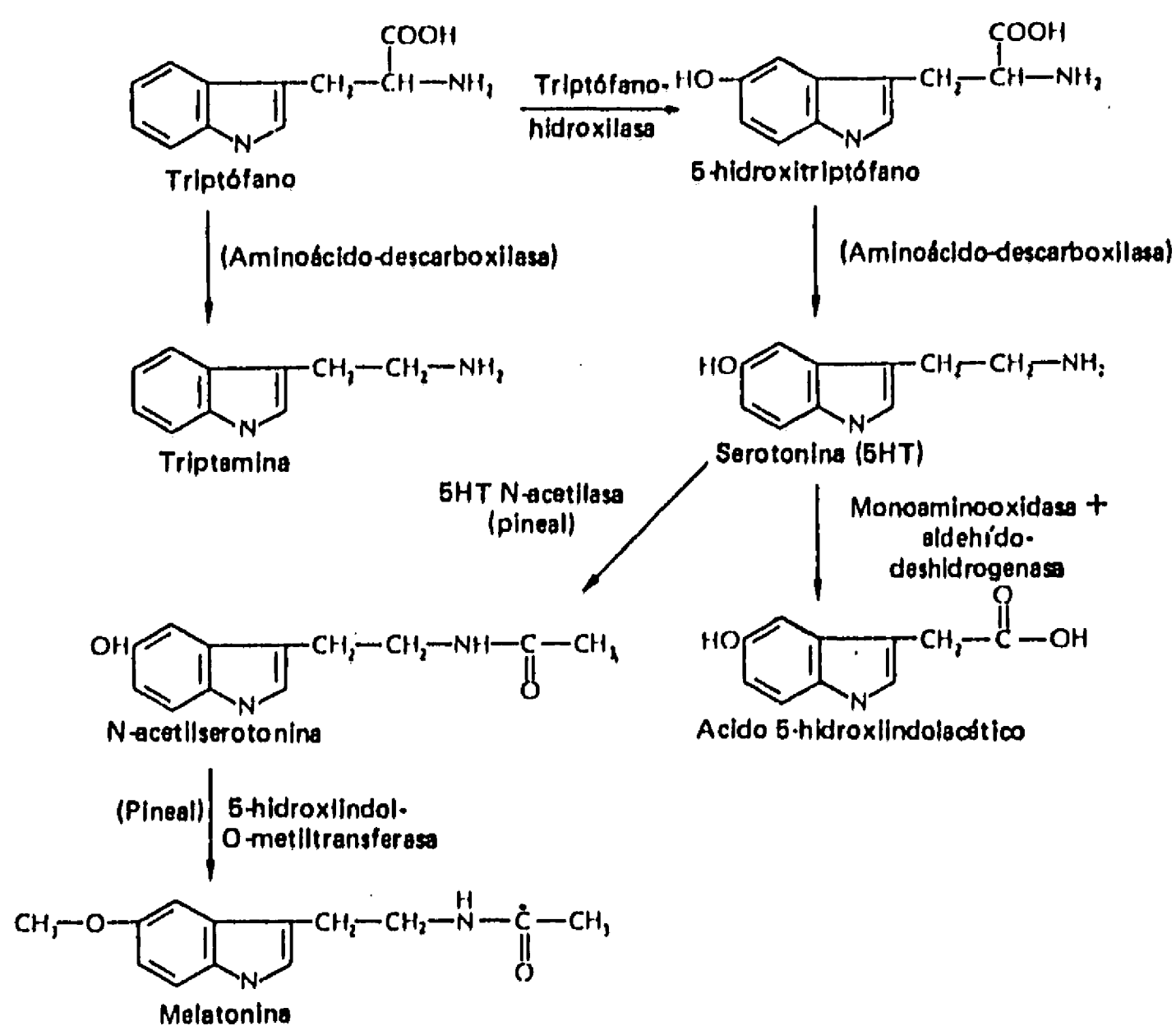
...te de la limitante en la tasa de formación de la serotonina fuera la hidroxilación inicial. Pero ya que este paso también depende del oxígeno molecular, la tasa de formación de 5-HT también podría ser influida por la concentración tisular de oxígeno. De hecho, puede demostrarse que las ratas a las que se les permite respirar 100% de oxígeno incrementan grandemente su síntesis de 5-HT. También es interesante que el 5-hidroxitriptófano no inhibe la actividad de la triptófano-hidroxilasa (Cooper y col., 1984).

Se cree que la tasa inicial de la síntesis sólo puede ser limitada por la disponibilidad de los requerimientos de cofactores del sustrato, como el oxígeno, la pteridina y el triptófano de la corriente sanguínea; o bien la tasa inicial de la síntesis puede ser limitada por otros factores de control menos importantes, más íntimamente relacionados con la actividad cerebral. De hecho, se empiezan a acumular pruebas que sugieren que el flujo de impulsos puede, al igual que en el caso de los sistemas de catecolaminas, iniciar cambios en las propiedades físicas de la enzima limitadora de la tasa, o sea, la triptófano-hidroxilasa. Se han postulado varios mecanismos para la regulación fisiológica de la triptófano-hidroxilasa inducida por alteraciones en la actividad neuronal dentro de las neuronas serotoninérgicas. La mayor parte de las pruebas apoyan la intervención de calcio en este proceso regulador acoplado de los impulsos (Cooper y col., 1984).

En los primeros estudios que se realizaron para observar el recambio de la serotonina en las neuronas se encontró que los experimentos en los que se administró crónicamente la dietilamina del ácido lisérgico (LSD) y otra estructura análoga al LSD, como el BOL-148, con acción similar a nivel periférico; existieron eviden-

...cias que indicaron que el BOL-148 incrementa el recambio de serotonina correspondientes a las cifras de radioactividad en la fracción de la amina y su producto (Andén y col., 1968; Dias y col., 1968; Lin y col., 1969).

### Serotonina (5-hidroxitriptamina)



### Vías metabólicas disponibles para la síntesis y metabolismo de la serotonina.

El incremento de los niveles de triptófano por un lado y de radioactividad por otra parte, es de interés, ya que por sí mismos podrían explicar gran parte de los cambios en el resto del sistema. Esta afirmación se basa en el hecho de que la  $K_M$  de la enzima triptófano-hidroxilasa limitante en la síntesis de serotonina, es del orden de la concentración cerebral del substrato. Es decir,

**FALLA DE ORIGEN**

cualesquier aumento en los niveles habituales de triptófano en el cerebro conducirían a un incremento en la síntesis y los niveles de serotonina, idea respaldada por los experimentos de carga de triptófano (Ashcroft y col., 1965; Airaksinen y col., 1968), su elevación en casos que se sabe incrementan la síntesis de serotonina (Tagliamonte y col., 1971) y los experimentos de inhibición de síntesis de proteínas que de forma moderada ocurre como consecuencia del LSD (Piha y col., 1963). El aumento del triptófano puede deberse a un incremento en la incorporación al cerebro, o bien a una disminución en su catabolismo (Díaz, 1985). Un cambio a nivel de la membrana que produjera un mayor transporte de triptófano al cerebro podría explicar las modificaciones subsecuentes de la vía (Tonge y Leonard, 1970). La segunda posibilidad incluiría la afección de algunas enzimas que utilizan triptófano como sustrato y que son cuantitativamente mucho más importantes que la enzima triptófano-hidroxilasa (Knox y Averbach, 1951).

En los animales tratados crónicamente con LSD, la reducción aguda de los niveles de 5-HIAA, retornan a los niveles normales; incluso se pone en evidencia que el catabolismo de serotonina se encuentra aumentado por las cifras de radioactividad en su fracción. El hecho de que los niveles de 5-HIA no se eleven al parejo de su síntesis puede residir en la mecánica del transporte de dicho metabolito. Este hecho pone en claro que se puede tener un aumento en el recambio de serotonina sin que se modifique el nivel de 5-HIAA, cuyos niveles se han tomado tradicionalmente como resultado de dicho recambio (Adén y col., 1968; Díaz y col., 1968).

En los experimentos realizados por Aghajanian y Freedman (1968) consideraron que el LSD ocupa el sitio de la serotonina a nivel del

receptor, lo que, a su vez y mediante un mecanismo (para esas fechas desconocido), dispararía una señal de retroalimentación inhibitoria a las células del rafe que responderían cesando la producción de serotonina y por lo tanto, de la descarga (más adelante se explicaran con todo detalle estos mecanismos, con todos los experimentos recientes al respecto).

Resulta interesante, el mostrar estas primeras aproximaciones al estudio del control de la autorregulación en la secreción de la serotonina.

En experimentos realizados por Diaz (1985) se encontró que el sistema de la serotonina se afecta persistentemente en el cerebro de la rata después de un mes de consumo oral, con dosis relativamente pequeñas de LSD. Dicho cambio puede resumirse como la adquisición de un nivel mayor de la actividad de la vía metabólica. Es decir, el recambio de las fracciones funciona a un nivel entre 25 y 50% mayor que en los animales control (Diaz, 1985).

En una evaluación precisa, acerca de los mecanismos bioquímicos que caracterizan la vía metabólica de la serotonina cerebral, Diaz (1985) estudió el efecto de cargas orales agudas y crónicas de triptófano sobre dicha vía, encontrando los siguientes resultados:

- 1.- La acumulación de triptófano en el cerebro no tiene límite.
- 2.- La incorporación de triptófano al cerebro está incrementada en las cargas de triptófano. La acumulación de triptófano marcado a partir del pulso de triptófano intracisternal indica que la incorporación del triptófano, lejos de estar disminuida como mecanismo de compensación por la gran cantidad de triptófano circulante, se encuentra aumentada. En otras palabras, el mecanismo de incorporación del triptófano no es

un mero paso de gradiente, sino un mecanismo activo que incorpora al aminoácido en relación directa a su concentración plasmática.

3.- La actividad específica del triptófano se abate durante la carga de este precursor debido a que el  $^3\text{H}$ -L-triptófano que se incorpora de la inyección intracisternal al cerebro se diluye en una inmensa poza de triptofano endógeno frío. Así, la actividad específica no necesariamente nos habla de la utilización del aminoácido, sino simplemente de la proporción de las moléculas marcadas y las no marcadas.

4.- Los incrementos en la serotonina endógena fueron prácticamente nulos en relación a la inmensa acumulación del precursor. Ya Ashcroft y col., 1966 y Grahame-Smith, 1971 habían encontrado el mismo fenómeno después de la administración de triptófano y este último había hecho una hipótesis de "derrame" para explicarlo.

Según la hipótesis, un exceso de triptofano se metabolizaría rápidamente en la vía de la serotonina, pero dando lugar a una fracción sin significado funcional que sería rápidamente desaminada por la MAO y de esta manera se mantendrían las pozas funcionales de serotonina relativamente estables. Este resultado respalda plenamente la idea del "derrame" de Grahame-Smith, 1971, en particular por la gran acumulación encontrada en el producto de la desaminación de la serotonina el 5-HIAA.

5.- La radioactividad en la fracción de serotonina está en relación estrecha con la actividad específica del triptófano. Este hallazgo se explica por la idea expresada arriba de

que la síntesis de serotonina se hace a partir de una poza de triptófano, que en estas condiciones de carga, está muy diluida en términos de radioactividad. Se considera que no es precisamente la serotonina recién sintetizada la que es funcionalmente activa.

- 6.- La acumulación del producto, mucho más cuantiosa que la de la serotonina, favorece las ideas anteriores ya que sus niveles representarían el balance de la cantidad de serotonina desaminada por la MAO y la salida del 5-HIAA, que se sabe es removido de la terminal por un mecanismo activo que se puede inhibir con probenecida.
- 7.- Existe un mecanismo adaptativo al tratamiento crónico del triptófano que se expresa claramente en las cifras de triptófano cerebral después de una carga única (370.62 nM/g) y de una diaria por catorce días (88.59 nM/g), así como en las cifras de incorporación del triptófano radioactivo.
- 8.- Los efectos de las cargas de triptófano crónico, que son muy patentes a las 6 horas de la última administración de 1 mg/kg/día/14 días, prácticamente desaparecen a las 18 horas y lo único que indica una modificación de la vía, es una muy discreta acumulación del producto. Este hecho señala que los niveles del 5-HIAA son un buen indicador de la dinámica de la vía cerebral de la serotonina.

Existen múltiples evidencias que indican que el triptófano tiene una relación directa con el metabolismo cerebral de la serotonina. Las alteraciones en la concentración de triptófano afectan la vía metabólica de la serotonina porque la KM de la enzima limitante del

sistema, la triptófano-hidroxilasa, no está saturada con sus substratos *in vivo* (Airaksinen y col., 1968; Lovenberg y col., 1968). Por ello, la disponibilidad del triptófano podría ser el factor limitante en la síntesis de serotonina (Gessa y Tagliamonte, 1974), restringiéndose a las condiciones normales y no al exceso de triptófano (Díaz, 1985).

Díaz, (1985) estudió si el estrés ocasionaba aumento en los niveles de serotonina. Encontró que la vía serotoninérgica en ratas usadas como control y aquellas que fueron manipuladas diariamente, los niveles de serotonina no mostraron diferencias en ambos grupos. En estudios similares Riege y Morimoto, en 1970, aplicando choques eléctricos en las patas de las ratas, a las que se les ocasionaba un estrés intenso por tal situación, se encontró que los niveles cerebrales de serotonina no eran afectados.

Por otra parte, existen experimentos en los que se valoró qué papel juega el ejercicio en la síntesis de serotonina y su metabolismo en los cuerpos celulares en el SNC de las ratas. Se encontró que al aplicarles cargas de triptófano en reposo y corriendo, las que corrían incrementaron los niveles de triptófano, serotonina y 5-HIAA en forma diferencial en diversas regiones cerebrales, encontrándose que en el estriado se hacían más pronunciados los cambios; estos resultados indican que bajo ciertas condiciones la utilización de triptófano en la vía de síntesis de 5-HT se altera en las terminales nerviosas serotoninérgicas, pero no en los cuerpos celulares de las ratas ejercitándose (Chaouloff y col., 1989).

En otro tipo de experimentos, en relación a la biosíntesis de la serotonina, se encontró que el piperine y dos de sus principales derivados: el antiepilepsirine (AE ó 3,4-metilendioxicinamolpiperine) y el compuesto 7448 (N-isopropil 3|4-clorofenil| propenoilamida) son

muy efectivos en la estimulación de la síntesis de 5-HT. El AE aumenta la relación de triptófano libre al unido en el plasma (TP) e induce a un aumento a largo plazo del incremento de este aminoácido en el cerebro, al mismo tiempo que produce un aumento duradero en el estriado y en el área límbica del ácido 5-hidroxiindolacético, y en menor grado un incremento en los niveles de la monoamina por sí misma. Junto a esta acción sobre el metabolismo de 5-HT, se encontró que la AE causa liberación de  $[3H]5-HT$  en preparaciones sinaptosomales *in vitro* (Liu y col., 1984).

En otros experimentos, utilizando técnicas cromatográficas específicas, para medir la 5-HT, el 5-HIAA y el triptófano (TRP), se encontró que no hay cambios en 5-HT ó 5-HIAA en la corteza de ratas cuando se dejaron en ciertas condiciones de temperatura "in situ" por 6 horas en un ambiente a temperatura de 4°C por 24 horas. De este experimento lo interesante fue solamente un mínimo incremento de 14% en la 5-HT observado después de 24 horas a 4°C en el estriado de los mismos animales. Las concentraciones de TRP, sin embargo, fueron incrementadas significativamente en ambas regiones cerebrales en este tipo de procedimiento tardío posmortem (McIntyre y Stanley, 1984).

También se ha encontrado por otra parte que la apomorfina (APO) y la clonidina (CLON) incrementan selectivamente las concentraciones de 5-HT en el rafe dorsal y en el estriado. La APO también incrementó los niveles de triptófano y el 5-HIAA en el rafe dorsal y sólo los niveles de 5-HIAA en el estriado. La clonidina no pudo alterar marcadamente los niveles de triptófano y 5-HIAA, mientras que disminuyó el grado de intercambio en ambas regiones, como lo indicaron los niveles en la relación 5-HIAA/5-HT. Los efectos de APO sobre 5-HT y 5-HIAA fueron atribuidos a la elevación del precursor de la 5-HT, el triptófano; mientras que los efectos de CLON sobre 5-HT y 5-HIAA



fueron debidos a la disminución del grado de intercambio de 5-HT (Lee, 1987).

También se ha visto que el compuesto 1-(m-trifluorometilfenil)-4-(p-aminofeniletíl)piperazine (LY 156163) que se ha reportado tener afinidad selectiva para el subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, produjo disminución en las concentraciones del 5-HIAA en el estriado e hipotálamo del mismo modo en que disminuyó la acumulación de 5-hidroxitriptófano después de la inhibición de la descarboxilasa por hidrobenzylhidrazine (Fuller y col., 1986).

Por otra parte, un estudio metabólico en ratas bajo condiciones de hipoxia hipobárica y normóxica, utilizando cromatografía líquida a alta presión (HPLC) y con detección electroquímica, se encontraron cambios en los niveles de la 5-HT y el 5-HIAA en el estriado e hipotálamo hipóxicos, sugiriéndose una inhibición de la formación de 5-HIAA y una interacción compleja entre la síntesis, liberación y recaptura (Saligaut y col., 1986).

También, en otros experimentos se midieron los niveles de serotonina y el 5-HIAA en un grupo de monos adultos cynomolgus, una hora después de que ingirieron una de cuatro dosis de una mezcla de carbohidratos con triptófano; los resultados fueron que se encontraron incrementados los niveles de serotonina y 5-HIAA significativamente en relación a la dosis, en el tallo cerebral y en el estriado, pero no en la corteza o hipotálamo (Leathwood y Fernstrom, 1990).

Los resultados experimentales antes señalados, apoyan fuertemente el argumento de que la biosíntesis y metabolismo de la serotonina en el sistema nervioso central, ocurre importantemente en el estriado y en otras estructuras que guardan una estrecha relación con el mismo, como son el rafe, corteza, área límbica e hipotálamo. Más adelante se detallará y ampliará esta información.

**ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA PARTICIPACION DE LA SEROTONINA EN LA CONDUCTA Y DESORDENES MENTALES.**

La serotonina deriva su nombre a partir de la observación que a mediados del siglo XIX, los científicos hicieron al detectar una sustancia en el suero que causaba fuertes contracciones en los órganos con músculo liso. El experimento consistió en que después de la coagulación de la sangre, lo que resultaba del suero (sangre defibrinada) incrementaba el tono vascular (etimológicamente sus raíces griegas son: seros=suero, tone=tono o fuerza).

Los primeros investigadores que reconocieron este fenómeno fueron Stevens y Lee (1884) y Brodie (1900). Posteriormente a estos descubrimientos los progresos en la identificación de la sustancia activa fueron lentos y mínimos, no fue sino hasta que Rapport y col., en 1948 aislaron una sustancia vasoconstrictora en el suero. En 1949, Rapport identificó la estructura 5-hidroxitriptamina, un compuesto que después fue sintetizado por Hamlin y Fisher (1951). Posteriormente a estos importantes descubrimientos se encontró que la serotonina está extensamente distribuida en la naturaleza, incluyendo estructuras neurales de algunos invertebrados y vertebrados, en 1953, Tawarog y Page pudieron demostrar su presencia en el cerebro de mamíferos. En los años siguientes, Amin y Col., (1954) reportaron variaciones regionales de 5-HT dentro del cerebro. Esto indicó la sugerencia de Bogdanski y col., (1956) y por Brodie y Shore (1957) de que la serotonina podía actuar como neurotransmisor en el cerebro, como posteriormente se demostró en diferentes preparaciones (Bloom, 1985; Green, 1989).

Cuando la serotonina se encontró por primera vez dentro del siste

...ma nervioso central de los mamíferos, se llegó a la teoría de que diversas formas de enfermedades mentales podrían deberse a anomalías químicas en su síntesis. Este tipo de pensamiento se extendió aún más cuando se observó que la sustancia tranquilizadora reserpina, agotaba la serotonina cerebral; a través de toda la duración de la disminución, se observó una profunda depresión en el comportamiento (Cooper y col., 1984).

Grantini y Valzelli (1965) consideraron a la serotonina como una molécula ubicua en todos los tejidos vivos, la cual desde su descubrimiento en el cerebro (Twarog y Page, 1953) ha sido un tema central en la investigación psiquiátrica (Ho y col., 1982). Gaddum (1953) y Woolley y Shaw (1954) sugirieron que la serotonina cerebral pudiera estar implicada en la fisiopatología de la esquizofrenia. Por esa misma fecha se descubrió a la reserpina, el principal alcaloide de la *rawolfia* cuyo uso para las enfermedades mentales data de milenios en la India; como ya se mencionó antes, tiene como principal efecto neuroquímico la disminución de la serotonina cerebral a niveles casi indetectables (Bogdanski y col., 1956). A partir de tales consideraciones, los estudios se centraron en encontrar una relación entre la serotonina o sus metabolitos y la esquizofrenia; a todo esto le siguieron mediciones de serotonina sanguínea en enfermos mentales, de sus productos en sangre, orina o líquido cefalorraquídeo, etc. (los interesados pueden consultar las extensas revisiones sobre el tema hechas por Airaksinen y McIsaac, 1968 y las de Wyatt y col., 1972). A una gran cantidad de especulaciones clínicas y de laboratorio en relación a enfermedades mentales, le siguió la búsqueda de alteraciones localizadas directamente en el tejido cerebral de enfermos a los que se les practicaba la autopsia. Los primeros estudios se realizaron en pacientes que cursaron con la enfermedad de Parkinson, se encontró en

la autopsia de estos pacientes una importante disminución de dopamina y serotonina en los ganglios basales (Bernheimer y col., 1961).

Como se puede apreciar, la serotonina juega un papel relevante en el sistema nervioso, se propone como un neurotransmisor en el SNC (Marraszi y Hart, 1955; Bogdanski y col., 1956; Brodie y Shore, 1957) a mediados de este siglo, y es a partir del año de 1963 cuando Wolley y Van der Hoeven señalan que el aumento de la serotonina cerebral afecta los procesos de aprendizaje. Un año después se encontró que la administración sistémica del precursor de la vía serotoninérgica, el 5-hidroxitriptófano en ratas, interfería en la respuesta en tareas de prevención activa (Joyce y Hurwist, 1964; Roffman y Lal, 1971).

## CAPITULO II

## EL SISTEMA SEROTONINERGICO ESTRIATAL.

## I.- Organización básica.

El término ganglios basales fue originalmente referido a toda la materia gris subcortical del telencéfalo: el núcleo caudado, el putamen, el núcleo acumbens, el globo pálido, el claustrum, la amigdala y la sustancia inominata.

Por otra parte, el cuerpo estriado incluye dos componentes: El neostriado que comprende al núcleo caudado y putamen, constituyendo la porción dorsal del estriado y al núcleo acumbens septal, que constituye el estriado ventral. El otro componente es el globo pálido, constituido por el segmento pálido externo e interno que forman el pálido ventral.

El **neostriado\*** (que en los roedores equivale al núcleo caudado fusionado con el putamen; también se le nombra simplemente como **estriado**) es dividido por la cápsula interna en el núcleo caudado y el putamen. Estas dos grandes masas son esencialmente indistinguibles respecto a su citología, sustancias transmisoras y conectividad general (Haber, 1986). Es a partir de 1960, cuando el núcleo acumbens septal se demostró que forma parte del estriado; conteniendo dopamina, acetilcolina y reportes posteriores señalan la presencia de serotonina (Battaglia y col., 1991; Pasik y col., 1984) al igual que facciones morfológicas comunes al estriado.

\* Ya que en el presente trabajo se describirán experimentos realizados en felinos y roedores, usaremos como sinónimos los términos **núcleo caudado**, **caudado**, **neostriado**, **estriado**. El que más se emplea es **estriado**.

El estriado esta principalmente formado en un 95% por neuronas de mediano tamaño (10 a 20  $\mu\text{m}$ ), el resto por neuronas más grandes (20 a 50  $\mu\text{m}$ ).

Cada categoría celular puede ser con o sin espinas dendríticas. Las neuronas de mediano tamaño con espinas son consideradas las neuronas de proyección o eferentes (Haber, 1986).

El estriado se considera la porción receptora de fibras aferentes de los ganglios basales.

#### **Fibras aferentes al estriado**

El mayor volúmen de entrada es de la neocorteza, con proyecciones específicas organizadas topográficamente que llegan a regiones también específicas al estriado. Son:

- 1.- Las proyecciones bifrontal, temporal superior y cortical cingular anterior a la porción ventromedial, la cual incluye el núcleo acumbens septal; la dorsolateral, prefrontal y corteza parietal posterior terminan en el campo estriatal central y lateral respectivamente (Selemon y Goldman-Rakic, 1985).
- 2.- Axones que desde el área premotora y motora terminan lateralmente en el putamen (Kunzle, 1975).
- 3.- Las que provienen del núcleo intralaminar (núcleo parafascicular y el centro medial) del tálamo (Haber, 1986) y,
- 4.- Dos sistemas aferentes provenientes del cerebro medio:
  - la vía serotoninérgica del núcleo del rafé dorsal.
  - la vía dopaminérgica proveniente de la pars compacta de la sustancia nigra y de las neuronas dopaminérgicas situadas más medialmente en el área tegmental de Tsai (Haber, 1986).

### *Fibras eferentes del estriado*

*El globo pálido es considerado como el sitio de salida de los ganglios basales. Está localizado medialmente al putamen y separado a partir de la lámina medular externa. Esta estructura se encuentra dividida por un delgado haz de fibras correspondientes a la lámina medular interna en dos segmentos: el pálido externo y el pálido interno.*

*Las fibras de entrada al complejo pálido provienen del estriado y el núcleo subtalámico, aunque los segmentos pálidos reciben masivamente fibras de entrada desde el estriado principalmente. Existe una importante distinción entre los segmentos respecto al blanco eferente:*

- 1.- El segmento externo proyecta primariamente al núcleo subtalámico el cual, vuelve a proyectarse sobre sí mismo a ambos segmentos del globo pálido. También envía fibras eferentes a la sustancia nigra.*
- 2.- El segmento interno proyecta al complejo ventral anterior/ventral lateral del tálamo, al núcleo intralaminar del tálamo, al núcleo habenular lateral y a los núcleos del tallo cerebral tegmento pedunculopontinos (Haber, 1986).*

*Recientemente se ha sugerido una región ventral a la comisura anterior que recibe entradas desde el núcleo acumbens, su citoarquitectura e histoquímica es indistinguible de la del globo pálido, sin embargo ésta se incluye en el complejo pálido (Haber y Nauta, 1983; Heimer y col., 1982). Esta región se refiere ahora como pálido ventral.*

*En el pálido dorsal, sus entradas derivan desde el estriado y en su salida proyecta al núcleo subtalámico y a la sustancia nigra.*

3.- *Fibras eferentes desde el pálido ventral proyectan al núcleo dorsal medio del tálamo y al área tegmentaria ventral del cerebro medio (Haber y col., 1985; Young y col., 1984).*

#### **ESTRIADO Y SEROTONINA**

*El mapeo neuroanatómico de células que contienen 5-HT, se hizo posible gracias al desarrollo de la técnica histoquímica Falck-Hillarp (Falck y col., 1962). Usando este método (fluorescencia de monoaminas) Dahlström y Fuxe (1964) pudieron mostrar la alta densidad de cuerpos celulares con 5-HT del núcleo del rafé; del mismo modo, se hicieron estudios que demostraron que este sistema es uno de los más extensamente distribuidos en la neurotransmisión en el cerebro de ratas, gatos y monos (Carlsson y col., 1964; Dahlström y Fuxe., 1965; Andén y col., 1966; Ungerstedt, 1971; Fuxe y Jonsson, 1974; Asmitia y Segal, 1978; Lidov y col., 1980; Parent y col., 1981; Steinbusch, 1981). La densidad de los cuerpos celulares con 5-HT marcados en el rafé se establecieron en diferentes grupos (B1-B9). Las fibras ascendentes desde estos núcleos en el rafé inervan el cerebro anterior via el haz medial del cerebro anterior. Los axones descendentes proyectan del rafé caudal a el asta dorsal y lateral, así mismo como a la columna celular intermediolateral de la médula espinal (Dahlström y Fuxe, 1964).*

*En la figura 2 se muestran las principales proyecciones desde los nueve diferentes grupos de células serotoninérgicas localizadas principalmente en el núcleo del rafé en la rata (citado en Ögren, 1985). La inervación serotoninérgica del cerebro anterior es en gran parte derivada de los cuerpos celulares ponto-mesencéfalicos del núcleo del rafé dorsal (grupo celular B7) y mediano (B8) los cuales dan proyecciones ascendentes al tele-diencéfalo inervando la corteza cerebral,*



hipotálamo, formación hipocámpal, el núcleo talámico, la amígdala, el cuerpo estriado, el tubérculo olfatorio y septum. La densidad y extensión de la inervación de la 5-HT de la corteza cerebral es tal, que las células del rafe pueden virtualmente contactar cada célula en la corteza cerebral (Fuxe y col., 1977; Lidov y col., 1980).

Una porción descendente de las proyecciones del grupo de células B7 y B8 envían axones a los núcleos del tallo cerebral y médula espinal en una forma similar a los axones bulboespinales. Los axones serotoninérgicos que descienden (bulboespinales) a la médula espinal originados de los cuerpos celulares en la región rostral, localizados en el núcleo del rafe pálido (B1), oscuro (B2) y magno (B3) (Dahlström y Fuxe, 1964; 1965) el cual forma un plexo denso de terminales en las células de la columna intermediolateral así como en el asta dorsal (lámina I y II) y ventral (Basbaum y col., 1978; Ruda y Gobel, 1980). Además, la mayoría de los cuerpos celulares contribuye (vía colaterales) a la inervación de zonas extensas en los núcleos del tallo cerebral y del cerebelo. Además, una densa red de terminales serotoninérgicas también inervan las cavidades ventriculares formando el plexo supraependimal (Chan-Palay, 1976). En síntesis, el notable rasgo del sistema 5-HT del tallo cerebral es sus grandes vías ascendentes y descendentes que inervan monosinápticamente todos los niveles del neuroeje. Además, los axones ascienden por todas partes, difundiendo en una extensa red que cubre enteramente la corteza cerebral (cuando se analicen las vías, se ampliará aún más este tema).

El desarrollo de anticuerpos a 5-HT (Steinbusch, 1981) provee una sensible herramienta en la localización de neuronas 5-HT en el sistema nervioso central. Por otra parte la técnica de autorradiografía facilita grandemente el mapeo de receptores 5-HT en los cerebros de

especies humanas y no humanas (Pazos y Palacios, 1985; Pazos y col., 1985; Hoyer y col., 1986a; 1986b). A continuación y empleando las técnicas arriba mencionadas y otras que ya se señalaron, se describirán una gran cantidad de resultados experimentales de los principales elementos serotoninérgicos que se encuentran en el estriado y sus principales mecanismos de control funcional.

### *Receptores a serotonina y mecanismos de control*

Los intentos para localizar terminaciones que contengan 5-HT por ultraestructura directa continúan basándose en la captación de análogos de 5-HT reactivos o de 5-HT marcada con isótopos. El uso de 5-HT marcada, análogos densos de electrones o toxinas selectivas a 5-HT (como las dihidroxitriptaminas) son confiables en cuanto a la especificidad de la selectividad por el proceso de captación.

La mayor parte de los estudios indirectos basados en la recaptación, usan cantidades de marcador mayores del  $K_M$  conocido de la recaptación selectiva, para incrementar la producción de elementos celulares marcados. Por lo tanto, las estructuras marcadas pueden ser de hecho estructuras que no contengan normalmente 5-HT. Las terminaciones de 5-HT detectadas autorradiográficamente en el cerebelo y la corteza cerebral, muestran distribuciones similares a las identificadas por histoquímica de fluorescencia (Cooper y col., 1984). Después de la inyección intraventricular de serotonina radioactiva, la mayor parte de las terminaciones nerviosas marcadas muestran grandes vesículas granulares y muchas vesículas pequeñas transparentes a los electrones (Cooper y col., 1984).

Antes de continuar con las características de receptores a 5-HT, en la siguiente página se muestra una figura con las principales vías a

serotonina en el sistema nervioso central.

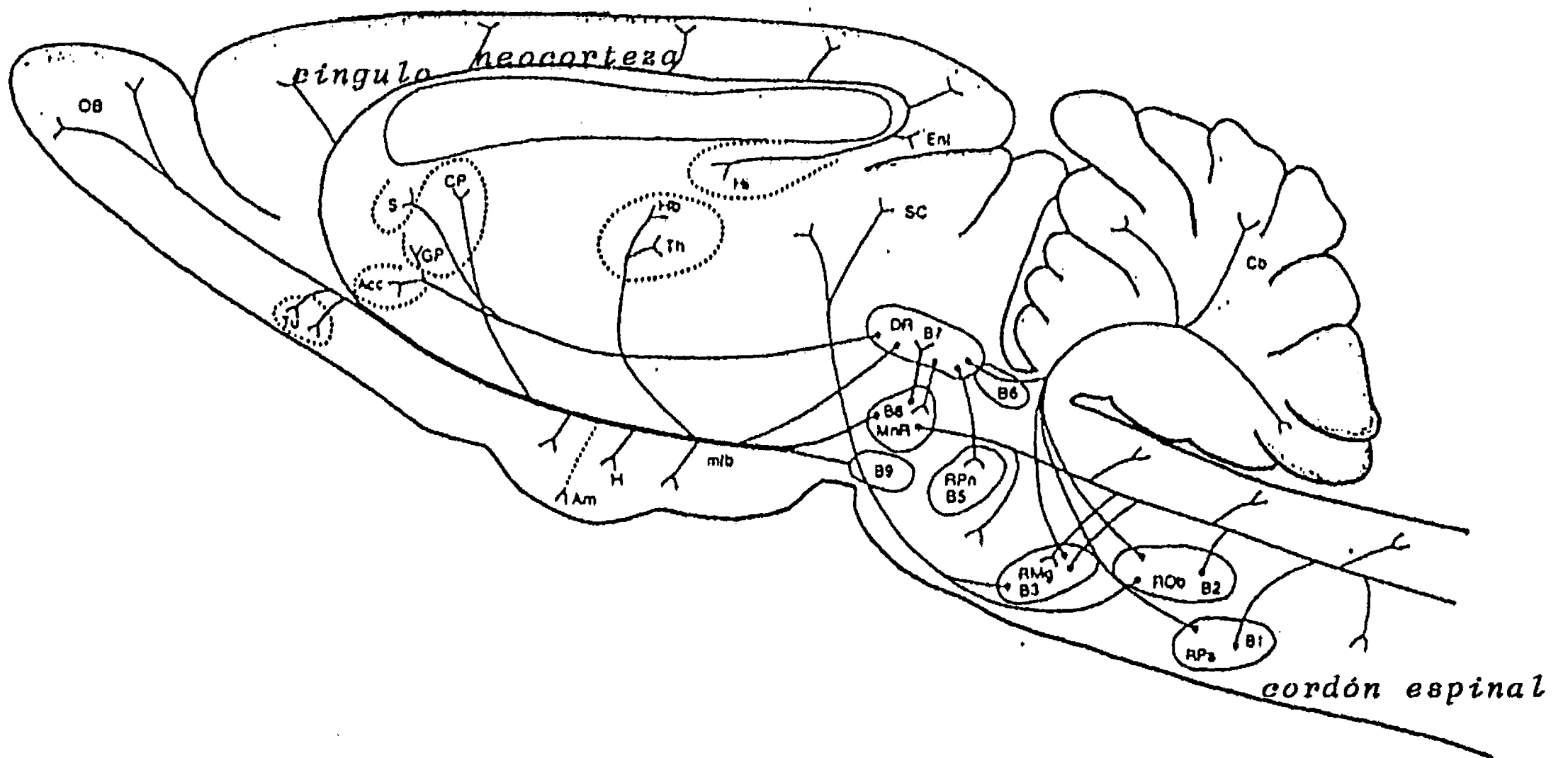


Figura 2. Ilustración esquemática de las principales vías serotoninérgicas en el sistema nervioso central de la rata, modificado después por Fuxe y Jonsson (1974) y Steinbusch (1981).

La siguiente nomenclatura fue usada:

Acc = n. acumbens	MnR = núcleo medial del rafe (B8)
Am = amígdala	OB = bulbo olfatorio
CP = caudado-putamen (estriado)	RMg = núcleo magno del rafe (B3)
Cb = cerebelo	ROo = núcleo oscuro del rafe (B2)
DR = núcleo dorsal del rafe (B7)	RPa = núcleo pálido del rafe (B1)
Ent = corteza entorrinal	RPn = núcleo pontino del rafe (B5)
GP = globo pálido	s = septum
H = hipotálamo	sc = colículo superior
Hb = habenula	Th = Tálamo.

Ögren (1985)

En 1957, Gaddum y Picarelli demostraron dos receptores distintos a 5-HT que mediaban los efectos en el músculo liso del ileón del conejillo de indias. Los dos receptores presumiblemente causantes de estos efectos fueron llamados M y D.

Los receptores a neurotransmisores están acoplados a dos tipos de sistemas efectores: uno de ellos a la proteína G como segundo mensajero y el otro a un canal iónico (Lester, 1988).

Estudios de uniones a radioligandos, han indicado que las uniones con  $^3\text{H}$ LSD tienen alta afinidad por los receptores 5-HT en la corteza cerebral de la rata (Farrow y Van Venekis, 1972; Bennet y Aghajanian, 1974). Subsecuentemente se vio que existen importantes diferencias en el patrón de uniones al receptor encontradas entre los ligandos:  $^3\text{H}$ 5-HT y  $^3\text{H}$ LSD (Bennett y Snyder, 1976; Fillion y col., 1976). El  $^3\text{H}$ spiperone fue utilizado para marcar un sitio de reconocimiento distinto a 5-HT (Creese y Snyder, 1978; Leysen y col., 1978; Quirk y col., 1978). Sobre la base de estas observaciones se distinguieron dos subtipos de receptores: el sitio receptor marcado con  $^3\text{H}$ 5-HT fue llamado 5-HT<sub>1</sub>, mientras que el sitio receptor marcado con  $^3\text{H}$ spiperone fue llamado 5-HT<sub>2</sub>. El  $^3\text{H}$ LSD se propuso como marcador en ambos receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> (Peroutka y Snyder, 1979). También se encontró que los sitios de unión a 5-HT<sub>1</sub> marcados por  $^3\text{H}$ 5-HT son heterogéneos, y estudios recientes han descrito una variedad de subtipos a 5-HT<sub>1</sub> (Pedigo y col., 1981; Schnellmann y col., 1984; ver Wang y Peroutka, 1988) más adelante se ampliará esta información.

El 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin (8-OH-DPAT), derivado del aminotetralin (Arvidsson y col., 1981; ver Arvidsson, 1987), se caracterizó farmacológicamente como agonista 5-HT, este hecho se comprobó al observar una disminución en la síntesis de 5-HT en la región cerebral

anterior en animales tratados con reserpina y la inducción del "síndrome 5-HT" (alteraciones locomotoras y secretoras en las ratas) (Hjorth y col., 1982; 1987). Bioquímicamente el compuesto es selectivo al sitio de unión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Middlemiss y Fozard, 1983; Hoyer y col., 1985; Palacios y col., 1987; ver Hamon y col., 1987). Principalmente se reconoció que esta droga tiene una acción peculiar en modelos de funciones serotoninérgicas centrales, tales como la conducta sexual en ratas machos, alimentación y termorregulación (Ahlenius y col., 1981; Dourish y col., 1985; Goodwin y Gree, 1985; Hjorth, 1985). Los agentes bloqueadores como el alprenolol y el pindolol han mostrado estereoselectividad para antagonizar las funciones serotoninérgicas en la rata (Green y Grahame-Smith, 1976; Costain y Green, 1978; Green y Goodwin, 1987; Hutson y col., 1988; Ahlenius y Larsson, 1989) y también han mostrado alta afinidad para el subtipo del receptor 5-HT<sub>1</sub> (Middlemiss, 1984; Hoyer y col., 1985b). Utilizando el [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT, los sitios 5-HT<sub>1A</sub> pueden marcarse selectivamente con un alto grado de especificidad.

Hamon y col. 1987 demostraron el marcaje del autorreceptor presináptico 5-HT con [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (Gozlan y col., 1983; Hall y col., 1985). El sitio receptor 5-HT<sub>1B</sub> fue marcado con [<sup>3</sup>H]cianopindolol (Hoyer y col., 1985a; Pazos y col., 1985), que ha sido identificado en ratas y ratones pero no en humanos, vacas, pollos o tortugas (Heuring y col., 1986).

Por otra parte, se han identificado diferentes subtipos al receptor 5-HT, como el 5-HT<sub>1C</sub> (Pazos y col., 1984; Schnellman y col., 1984); 5-HT<sub>1D</sub> (Heuring y Peroutka, 1987); 5-HT<sub>3</sub> (Bradley y col., 1986) y también receptores 5-HT<sub>4</sub> (Dumuis y col., 1988). Por otra parte se ha sugerido que el 8-OH-DPAT es un agonista parcial a 5-HT, el cual, posiblemente se relaciona preferentemente activando autorreceptores

(Engel y col., 1984; Ahlenius y Lasso, 1985; Gerber y col., 1985; Carlsson y Eriksson, 1986; Colino y Halliwell, 1987).

Existen autorreceptores serotoninérgicos en la terminal presináptica y en la región del cuerpo celular (ver figura 3). La estimulación de autorreceptores somato-dendríticos por 5-HT y compuestos relacionados han mostrado disminuir la frecuencia de descarga de las neuronas

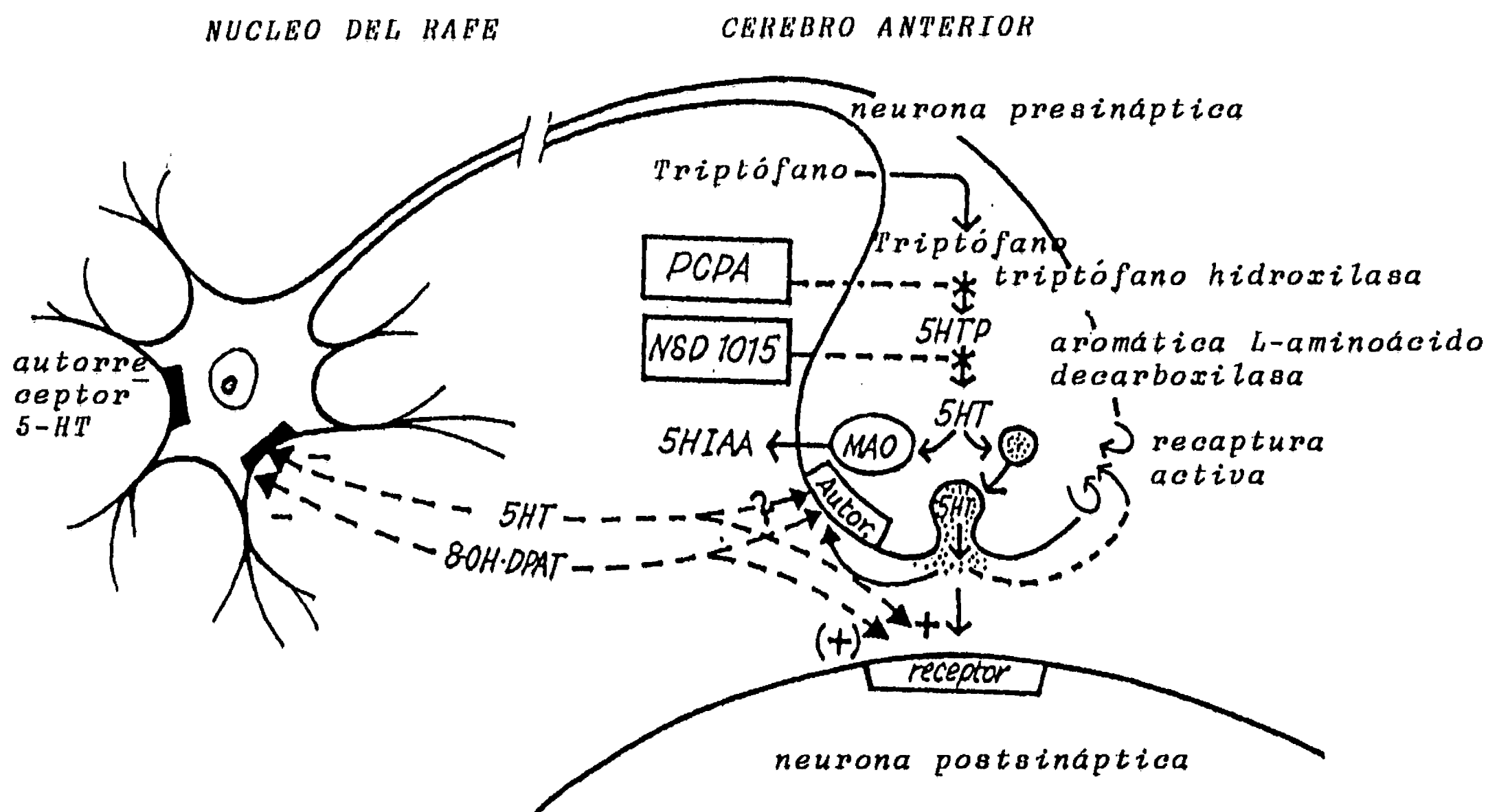


Figura 3. Representación de una neurona serotoninérgica: cuerpo celular y región terminal

Hillegaart (1991)

serotoninérgicas (DeMontigni y Aghajanian, 1977; Haigler y Aghajanian, 1974; ver Aghajanian y col., 1987), así como la síntesis (Hamon y col., 1988; Hjorth y Magnusson, 1988; Invernizzi y col., 1991) y la liberación (Cerrito y Raiteri, 1979; Galzin y col., 1985; Hutson y col., 1989; Sharp y col., 1989) en relación a la 5-HT del cerebro anterior.

FALLA DE ORIGEN

Una vez conocidos los principales subtipos de receptores a 5-HT y la existencia de autorreceptores a 5-HT y su posible funcionamiento, pasaré a señalar cuales son los subtipos de receptores que encontramos en el estriado, para posteriormente poder entender su participación en diferentes respuestas fisiológicas.

### **Estriado y subtipos de receptores**

Utilizando lesiones selectivas con 5,7-hidroxitriptamina en las proyecciones serotoninérgicas de los núcleos del rafe, se encontró una marcada pérdida de los sitios de unión a  $[^3H]$ -8-OH-DPAT en el estriado y la corteza cerebral, indicando que estos sitios se localizan pre-sinápticamente. En contraste, los sitios de unión  $[^3H]$ 5-HT permanecieron sin cambios en las ratas lesionadas, lo cual confirmó adicionalmente su localización post-sináptica en el cerebro (Hall y col., 1986).

En los primeros estudios en donde se utilizaron radioligandos, Heuring y Peroutka (1987) haciendo estudios en membranas de bovinos y empleando diferentes agentes farmacológicos para competir con los subtipos 5-HT<sub>1A</sub>, B, C; 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub>, encontraron un nuevo tipo de receptor a 5-HT<sub>1</sub> que llamaron 5-HT<sub>1D</sub>. A partir de este hallazgo, se ha hecho una gran cantidad de experimentos en diferentes especies animales y en humanos en donde se ha detectado en las membranas estriatales al subtipo de receptor 5-HT<sub>1D</sub> (Hoyer y col., 1988; Herrick-Davis y Tittelar, 1988; Waeber y col., 1988; Peroutka y col., 1991; Pauwels y col., 1993).

En otros experimentos, en donde se encontraron sitios de unión a 5-HT<sub>1D</sub> en el estriado humano, se dedujo su posible acoplamiento a una proteína asociada al nucleótido GTP (trifosfato de guanina) (Peroutka y

col., 1989). En estudios parecidos, pero utilizando estriado de porcino, se encontró que los receptores 5-HT<sub>1D</sub> interactuaban con proteínas también asociadas a GTP (Herrick-Davis y col., 1988). Por otra parte, en estudios de autorradiografía post-mortem en pacientes que cursaron con la enfermedad de Huntington, se localizaron receptores a 5-HT<sub>1D</sub> en la corteza frontal y en el estriado (Gonzalez-Heydrich y Peroutka, 1991). En este mismo tipo de pacientes y empleando autorradiografía *in vitro*, se encontró una marcada disminución en la densidad de uniones a receptores en ganglios basales y sustancia nigra, sugiriendo estos resultados la presencia de receptores 5-HT<sub>1D</sub> en el estriado (Waeber y Palacios, 1989).

Estudios recientes, han identificado los genes que codifican a los receptores 5-HT<sub>1D</sub> en el estriado de monos y humanos, cuyo sitio de localización se determinó en el cromosoma 6 (Demchysyn y col., 1992).

En relación a la existencia de otros subtipos de receptores, Peroutka en 1985, encontró un sitio de unión que se marcaba con 8-OH-DPAT en las membranas hipocampales en bovinos a los que llamó 5-HT<sub>1A</sub>, mientras que con [<sup>3</sup>H]5-HT en membranas estriatales marcó al subtipo 5-HT<sub>1B</sub>, sugiriendo que los sitios de unión 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> son distintos, pudiéndose marcar con su ligando específico [<sup>3</sup>H] regiones cerebrales específicas. Anteriormente en 1984, Marcinkiewics y col., utilizando la técnica de autorradiografía y marcando a [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT encontró que los receptores 5-HT<sub>1</sub> son heterogéneos y que el [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT reconocía sólo al subtipo 5-HT<sub>1</sub> (llamado ahora 5-HT<sub>1A</sub>).

#### **Estriado y receptores 5-HT<sub>2</sub>**

En estudios de localización y caracterización por autorradiografía



cuantitativa empleando el ligando  $|^{125}\text{I}| \text{LSD}$  que se une a receptores 5-HT<sub>2</sub> se observó que éstos se encontraban en la corteza cerebral, estriado, claustrum, tubérculo olfatorio, núcleo acumbens, epéndimo, núcleo mamilar y oliva inferior (Nakada y col., 1984); empleando el mismo marcador  $|^{125}\text{I}| \text{LSD}$ , el estudio se hizo en diversas regiones cerebrales seguido a la inyección intraventricular del radioligando, los más altos niveles de unión se encontraron en corteza frontal, tubérculo olfatorio, corteza extrafrontal y estriado (Hartig y col., 1985). En otros estudios, utilizando diferentes radioligandos que se unen a 5-HT<sub>2</sub>, tales como  $|^3\text{H}| \text{spiperone}$ ,  $|^3\text{H}| \text{LSD}$ ,  $|^3\text{H}| \text{mianserina}$  y  $|^3\text{H}| \text{ketanserina}$ ; se localizaron receptores a 5-HT<sub>2</sub> en la corteza frontal, estriado, núcleo acumbens, tubérculo olfatorio en las membranas de gatos y humanos (Leysen y col., 1984). En otra serie de experimentos *in vitro* con  $|^{125}\text{I}| \text{LSD}$  en ratas, usando autorradiografía, se encontraron uniones a dopamina (D<sub>2</sub>) y a 5-HT<sub>2</sub>; el reconocimiento se realizó a través de ketanserina, encontrándose en neocorteza y estriado, con una posible interacción de dopamina y serotonina (Altar y col., 1986). De igual forma, pero utilizando diferentes tipos de radioligandos para la identificación de diversos subtipos de receptores en membranas de cerebros humanos, de puerco y ternera se encontraron los siguientes sitios de alta afinidad para los siguientes marcadores: 8-OH-DPAT para 5-HT<sub>1A</sub>, 21-009 y RU 24969 para 5-HT<sub>1B</sub>, mesulergine y mianserina para 5-HT<sub>1C</sub>, ketanserina y cinanserin para 5-HT<sub>2</sub> en el estriado (Waeber y col., 1988). En otros experimentos y utilizando el ligando  $|^3\text{H}| \text{spiroperidol}$ , se encontraron sitios de unión a 5-HT<sub>2</sub> en membranas de estriado en ratas (Oelssner y col., 1983; McGonigle, 1988).

En otros experimentos utilizando ensayos clínicos con tomografía por emisión de positrones, empleando  $Ni^{11C}$ -metil)-2-Br-LSD ( $^{11C}$ -MBL) y llevándose a cabo en 7 voluntarios humanos, se encontró un marcaje en las siguientes estructuras: corteza frontal, temporal y parietal con menores niveles en el estriado. El  $^{11C}$ -MBL es un radioligando selectivo que puede usarse para monitorear la densidad de receptores 5-HT<sub>2</sub> en vivo (Wong y col., 1987). En estudios similares en el cerebro humano, utilizando también tomografía por emisión de positrones, pero marcando con <sup>18</sup>F septoperone a los receptores 5-HT<sub>2</sub>; se encontró una curva de retención para el marcador en la corteza frontal y en el estriado (Blin y col., 1990).

En estudios inmunológicos y empleando anticuerpos a receptores, con técnicas de autorradiografía se han detectado receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub> y 5-HT<sub>2</sub> en la corteza cerebral, estriado y núcleos del rafé (Tamir y col., 1991).

En otros estudios empleando experimentos genéticos Saltzman y col. (1991) realizaron clonaciones para la deducción de los códigos (cDNA) para receptores 5HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> en humanos, posteriormente se compararon respectivamente sus contrapartes en ratas, encontrándose solamente pequeñas diferencias en la N-terminal, la C-terminal y la vuelta de la cadena de DNA cuando se compararon respectivamente entre especies.

En otros experimentos y utilizando un tratamiento con el neuroléptico atípico clozapine (CLZ) y la técnica de autorradiografía cuantitativa en ratas, se encontró que la densidad de receptores 5-HT<sub>2</sub> en la corteza frontal, estriado y núcleo acumbens disminuyó posterior al tratamiento antes mencionado en un 37% (O'Dell y col., 1990).

Por último, para concluir respecto a los receptores 5-HT<sub>2</sub>, Roth y col. en 1987 caracterizaron dos sitios de reconocimiento a  $^3H$ ketanserina en el estriado de la rata. Un sitio de alta afinidad ( $kD=0.39$

nm) similar al sitio 5-HT<sub>2</sub> previamente caracterizado por varios investigadores. Y un sitio de baja afinidad ( $K_D=21,8$  nM) caracterizado por una particular especificidad farmacológica y que está preferentemente localizado en el estriado y septum en la rata; los antagonistas convencionales a 5-HT<sub>2</sub>, así como la 5-HT y los inhibidores de la recaptura a 5-HT<sub>2</sub> son inefectivos para inhibir las uniones [<sup>3</sup>H]ketanserina a estos sitios de baja afinidad. Por otra parte se ha visto que el tratamiento crónico con p-clorofenilalanina que como ya se ha dicho disminuye la serotonina cerebral, regula sólo a los sitios de alta afinidad. Hasta el momento, en el estriado y el septum, la [<sup>3</sup>H]ketanserina marcó un sólo sitio de reconocimiento, que recientemente se ha demostrado está asociado con terminaciones nerviosas dopaminérgicas y que puede participar en la liberación de las aminas biógenicas.

#### **Otros receptores en el estriado**

Abi-Dargham y col. (1983) encontraron uniones con el ligando [<sup>3</sup>H]LY 278584 en áreas estriatales y límbicas, este mismo marcador anteriormente se había utilizado para marcar receptores 5-HT<sub>3</sub> en la corteza cerebral de la rata, lo cual indica la presencia de receptores 5-HT<sub>3</sub> en el estriado.

Por otra parte, utilizando [<sup>3</sup>H]ketanserina se encontró que este radioligando marca sitios de unión no serotoninérgicos a [<sup>3</sup>H]ketanserina y que es posible su papel regulador en la liberación de monoaminas, estos sitios correspondieron en cuanto a sus propiedades a la de los sitios de unión no serotoninérgicos a ketanserina previamente caracterizados en el estriado de la rata (Leysen y col., 1988; 1991).

En experimentos similares, pero estudiando la corteza frontal y el estriado de conejo, se utilizó la  $|3H|$ ketanserina, encontrándose los receptores no serotoninérgicos antes referidos (Dewar y col., 1990). Por último, también se han descubierto receptores opiodes sobre las terminales nerviosas serotoninérgicas, los cuales pueden modular la actividad presináptica de tales terminales (Parentini y col., 1983).

## CAPITULO III

SEROTONINA, VIAS NEUROTRANSMISORAS Y REGULACION SEROTONINERGICA  
EN EL ESTRIADO*Serotonina*

En experimentos recientes, se exploraron los cambios del precursor de la serotonina, en las neuronas del estriado y la respuesta local a la serotonina en ratas a las que se les aplicó un choque electroconvulsivo, encontrándose:

- 1.- El choque electroconvulsivo disminuye la cantidad del precursor en las neuronas del estriado y bloquea la respuesta excitatoria producida por la serotonina en pequeñas cantidades de neuronas sensibles.
- 2.- Los resultados están probablemente relacionados con cambios transitorios en la afinidad de los receptores y constantes de disociación, los cuales pueden implicar la recuperación de la memoria (Contreras y col., 1994).

En otros experimentos, se estudio la utilización y la recaptura del  $^3\text{H}$ -5-hidroxitriptófano ( $^3\text{H}$ -5-HTP) en el cerebro humano, a través de la tomografía por emisión de positrones. El estudio se efectuó en 6 varones sanos voluntarios a los que se les administró un tratamiento previo con benzeraside, P-clorofenilalanina (PCPA) y 5-HTP no marcado. Todos los fármacos administrados, incrementaron significativamente la recaptura de  $^3\text{H}$ -5-HTP. El grado de utilización en el estriado y la corteza frontal fueron muy altos, confirmándose de esta manera la importancia que tiene la sero-

...tonina en el estriado (Reibring y col., 1992).

Por otra parte se ha valorado la neurotransmisión de monoaminas y sus metabolitos en regiones cerebrales post-mortem en pacientes que cursaron con la enfermedad de Alzheimer (EA), determinándose lo siguiente:

1.- La concentración de aminas neurotransmisoras; noradrenalina (NA), dopamina (DA) y 5-hidroxitriptamina (5-HT), así como sus metabolitos ácidos; el ácido homovanílico (HVA) y el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) fueron determinados en pacientes dementes con o sin enfermedad de Alzheimer, se concluyó:

- a) la deficiencia de NA fue en la corteza temporal de EA, pero no en pacientes sin EA.
- b) el estriado en particular, tuvo daño en el sistema dopaminérgico en pacientes con EA, con bajos niveles de HVA.
- c) en las regiones de amígdala, estriado y corteza temporal la 5-HT fue significativamente disminuida en pacientes con EA y el 5-HIAA también disminuyó en amígdala y estriado (Nazarali y Reynolds, 1992).

En esta misma línea, en un estudio post-mortem de lo que ocurre en las neuronas noradrenérgicas, GABAérgicas y serotoninérgicas en la Enfermedad de Alzheimer's/Demencia Senil Tipo Alzheimer (EA/DSTA), se estudiaron 20 muestras histológicas de los casos EA/DSTA confirmados, comparados con 14 pacientes control. Las concentraciones de NA fueron disminuidas significativamente en la corteza frontal, corteza temporal, hipocampo y putamen en EA/DSTA. Los niveles de serotonina fueron significativamente disminuidos en la corteza hipocampal,

hipocampo y estriado; también la concentración de 5-HIAA, fue reducida en 3 áreas corticales, tálamo y estriado en pacientes con EA/DSTA en ambos casos. Un hallazgo importante fue que el daño más severo se encontró en las neuronas 5-HT que en la NA (Reinikainen y col., 1988). Por otra parte se ha visto que altas concentraciones de 5-HT en el estriado pudieran ser las causantes de procesos degenerativos en la Enfermedad de Huntington's. Se efectuaron estudios en donde se midieron la distribución rostrocaudal de serotonina, dopamina y sus metabolitos en el estriado de pacientes que cursaron con la enfermedad de Huntington's; los niveles de serotonina y 5-HIAA se encontraron elevados en la mayoría de las divisiones estriatales, mientras que las concentraciones de dopamina y su metabolito el ácido homovanílico fueron marcadamente menores (Kish y col., 1987).

En otro tipo de investigaciones en donde se midieron los niveles extracelulares de serotonina endógena y su metabolito el 5-HIAA en el estriado de ratas anestesiadas y en estado de alerta usando las técnicas de cromatografía líquida a alta presión con detección fluorimétrica, se encontró que el bloqueo de la recaptura de 5-HT por indalpine, incrementó los niveles extracelulares de 5-HT en seis veces cuando se agregó al medio de perfusión (1  $\mu$ M), y tres veces cuando se administró intraperitonealmente (5 mg/kg). En contraste, los niveles de 5-HIAA quedaron sin afectarse durante la aplicación de indalpine (Kalen y col., 1988).

En estudios con autorradiografía, utilizando el ligando [ $^3$ H]citalopran con afinidad a los receptores 5-HT para la localización y distribución de los sitios de unión a dichos receptores en tejidos cerebrales post-mortem en pacientes con Enfermedad de Parkinson (EP), Parálisis Supranuclear Progresiva (PALSYP) y personas envejecidas

como controles. La densidad de los sitios de unión a  $|^3H|$ citalopran se encontraron disminuidos significativamente en todos los componentes de los ganglios basales en aquellos pacientes con EP, pero sólo en la cabeza del estriado en pacientes que cursaron con PALSY. La densidad a los sitios de unión a citalopran en el núcleo del rafe en la EP fue comparable a los controles. Estos datos indican que las terminales serotoninérgicas están diferencialmente afectadas en la EP y en PALSY (Chinaglia y col., 1993).

En estudios efectuados para valorar los efectos de la edad y los cambios en los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos en cerebros de roedores y humanos, así como los efectos de las enfermedades neurodegenerativas sobre dichos sistemas, se encontró que el sistema dopaminérgico exhibió un decaimiento relacionado con la edad en los sitios presináptico y postsináptico. Presinápticamente los niveles de dopamina y el número de neuronas en el cerebro medio que contienen dopamina decayó en un 50% en la edad avanzada en ausencia de enfermedad neurológica. Postsinápticamente, la densidad de receptores a dopamina decreció en un 40% para D2, mientras que los receptores D1 se incrementó (humanos) o se encontró estable (roedores).

Por otra parte, se han reportado disminuidos los niveles de dopamina y receptores D2 en la enfermedad de Alzheimer's, pero estos cambios son relativamente pequeños, y no son consistentemente observados. En relación a serotonina los niveles de ésta parecen estables durante la edad normal, las uniones marcadas a  $|^3H|$ imipramina se incrementaron presinápticamente. En el cerebro humano, los dos principales receptores a serotonina (5-HT1 y 5HT2) disminuyen de un 30 a 50% a través de la longevidad. En la enfermedad de Alzheimer's, el sistema serotoninérgico pre y postsinápticamente se encuentra marcadamente reducido en ambos casos, incluyendo una pérdida en



las neuronas serotoninérgicas del rafe. La pérdida adicional de receptores a serotonina en la EA es de aproximadamente un 80% cuando se compara con jóvenes normales. A través de estos descubrimientos, se ha formulado una hipótesis tentativa en el sentido de explicar el porqué típicamente es en la juventud en la que se presenta el inicio de la esquizofrenia (usualmente antes de los 30 años de edad) y en la edad avanzada el Parkinsonismo (raramente antes de los 50 años de edad) en ambos casos existen alteraciones en los receptores a DA y 5-HT dentro del contexto de trastornos neurológicos (Morgan y col., 1987).

En otros experimentos, para valorar la existencia de serotonina en el estriado, se estimuló eléctricamente al haz medio del cerebro anterior lo que resultó en un aumento bilateral del metabolismo de 5-HT, indicado por el incremento de la relación 5-HIAA/5-HT en el estriado de las ratas (Szostak y col., 1986). Por otra parte en experimentos en donde se ha empleado el 5-metoxi-3-(di-n-propilamino) croman (5-MeO-DPAC) se produjo un decremento dosis-dependiente en la acumulación de 5-hidroxitriptófano, después de la inhibición de la descarboxilasa en el estriado, hipocampo y corteza frontal de la rata. La disminución del cambio de serotonina pudo haber resultado a partir de la activación de receptores 5-HT sobre cuerpos celulares de neuronas 5-HT que proyectan al estriado y a las otras regiones cerebrales, puesto que el 5-MeO-DPAC como se ha comentado carece de afinidad para los sitios de unión estriatales (Fuller y col., 1989).

En investigaciones en las que se aplicaron inyecciones i.p. de fluoxetine (inhibidor de la recaptura de serotonina) en ratas a una dosis de 10 mg/kg, se observó que rápidamente se incrementan las concentraciones de serotonina en el fluido de microdialisis en el estriado por lo menos cuatro veces, incremento que fue mantenido a través

de un periodo de observación de tres horas (Perry y Fuller, 1992).

En otros experimentos, se estudió la utilización de la droga 3,4-metilenedioximetanfetamina (MDMA), misma que es capaz de producir un marcado cambio a largo plazo en el sistema serotoninérgico. A través del uso de autorradiografía cuantitativa *in vitro* y marcando los sitios de recaptura con  $^3\text{H}$  paroxetine para evaluar el efecto tiempo-dependiente del MDMA sobre neuronas 5-HT en sitios neuroanatómicos específicos. Después del tratamiento con MDMA (20 mg/kg b.i.d. por 4 días), fue observado un marcado decremento en los sitios de recaptura a 5-HT en aquellas regiones cerebrales conocidas como receptoras a las proyecciones de neuronas 5-HT. Estas regiones incluyeron: corteza cerebral, estriado, hipocampo, núcleo acumbens, tubérculo olfatorio, colículo superior e inferior, núcleo geniculado y la mayor parte del núcleo talámico. En la mayoría de las regiones, el decremento en los sitios de recaptura a 5-HT ocurrió dentro de las 24 horas de la última dosis de MDMA y persistió a las dos semanas del tiempo indicado. Algunas regiones tales como el estriado dorsal exhibió una reducción dependiente del tiempo, las mayores reducciones ocurrieron a las dos semanas, más bien que inmediatamente seguido al régimen de tratamiento con MDMA. Estos resultados indican que la degeneración preferencial por MDMA en las neuronas 5-HT es en las regiones terminales, mientras que el pericarión y axones de tránsito restantes no son casi afectados. En suma, las reducciones observadas tiempo-dependientes y la recuperación de los sitios de recaptura a 5-HT, los cuales fueron detectados dentro de las dos semanas del régimen de tratamiento en ciertas regiones cerebrales, y sugieren diferencias de regiones que son específicas en la recuperación del sistema 5-HT a partir de la lesión inducida por MDMA (Battaglia y col., 1987; 1991).

En esa misma línea, cuando se administró una dosis subcutánea de MDMA (20mg/kg) en ratas, se observó una marcada reducción en la concentración de 5-HT en el estriado en un 75% en relación al control, una semana después de la aplicación. Por otra parte, se observó que el tratamiento previo con ritanserina (bloqueador de los receptores 5-HT<sub>2</sub>) previno tal decremento, lo que hace suponer el papel que juegan los receptores 5-HT<sub>2</sub> en el mecanismo por el cual una alta dosis de MDMA indujo el daño neuronal en el sistema serotoninérgico (Johnson y col., 1993). Estudiando el efecto agudo del MDMA sobre las monoaminas en el estriado de la rata, se detectaron los niveles extracelulares de dopamina (DA), el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), el ácido homovanílico (HVA), el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y serotonina (5-HT). El análisis se efectuó en el estriado de ratas con libre movimiento utilizando microdiálisis y cromatografía líquida de alta presión con detección electroquímica (HPLC-EC) para detectar los cambios en la liberación. Las diálisis fueron ensayadas a intervalos de 20 minutos por cuatro horas después de cada inyección intraperitoneal de MDMA (10 mg/kg). Se encontró que el MDMA incrementó la liberación y contenido de DA; el DOPAC Y HVA fueron reducidos. La liberación de 5-HT también se incrementó y posteriormente disminuyeron los niveles estriatales en tres horas. El contenido de DA extracelular fue 686% en comparación al control a los 80 minutos, los niveles en el estriado fueron de un 122% a los 120 minutos. La liberación extracelular de 5-HT fue de 123% a los 20 minutos, para luego decrecer. Con estos resultados podemos considerar que los efectos del MDMA en el estriado es más pronunciado en el sistema de DA, que en el de 5-HT (Gough y col., 1991).

En otras investigaciones, se ha encontrado que el 6R-tetrahidrohidrobiopterin (R-THABP) administrado en microdiálisis cerebral en ratas anestesiadas con uretano, a una dosis de 1.0 nM, incrementó la serotonina en el estriado (Mataga y col., 1991).

En otros experimentos, se determinó la distribución topográfica de la dopamina y serotonina en el estriado de la rata, utilizando HPLC-EC, los resultados fueron los siguientes: Hubo un gradiente rostro-caudal para la DA y la 5-HT; con la DA elevada en el estriado dorsal y la 5-HT elevada en el estriado caudal. Las concentraciones de DA en el plano coronal mostró una distribución homogénea, excepto a nivel del globo pálido. La 5-HT se distribuyó más heterogéneamente en el plano coronal con concentraciones altas en los cuadrantes ventromedial y ventrolateral, ellos fueron de 2 a 3 veces mayores que en el estriado dorsal. La relación HIAA/5-HT fueron altas en el estriado dorsolateral. Estos resultados proveen una fuerte evidencia en cuanto a la compartimentalización funcional dentro del estriado (Beal y Martin, 1985).

#### **Distribución y función de las vías serotoninérgicas en el estriado**

Las neuronas serotoninérgicas en los cerebros de mamíferos, comprende uno de los sistemas químicos más extendidos hasta ahora conocidos. Como ya hemos comentado antes, los cuerpos celulares están confinados a la región de la línea media (rafé) del tallo cerebral en dos grupos generales:

A) Un grupo superior que consiste de:

- núcleos del rafé dorsal..... (B-7 y B-6)
- núcleos del rafé medio..... (B-8 y B-5)

- núcleo caudal lineal..... (rostral B-8)
- núcleo supralemniscal..... (B-9)

B) Un grupo inferior que consiste en:

- núcleos del rafé obscuro..... (B-2)
- núcleos del rafé pálido..... (B-1)
- núcleos del rafé magnus..... (B-3)
- núcleos de la médula ventral lateral  
y área postrema..... (B1/B3)

Los axones de estas células proyectan a todo el SNC: al neuroeje, desde el cordón espinal hasta el bulbo olfatorio y desde la corteza cerebral hasta el hipotálamo. El desarrollo de este enorme sistema, se inicia tempranamente en la gestación y es influenciado por una gran variedad de factores reguladores del desarrollo, incluyendo a la proteína astrogliar beta S-100. Las evidencias se orientan a señalar que el sistema serotoninérgico juega un papel relevante en la maduración del cerebro a través de la interacción con los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, los cuales son más densos durante estos periodos del desarrollo temprano. El receptor 5-HT<sub>1A</sub> se localiza en neuronas y astrocitos, a partir de estas últimas células puede estimularse la liberación de la proteína beta S-100. El papel que juegan en el desarrollo los receptores 5-HT<sub>1A</sub> es dominante durante la maduración cerebral así como durante el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer's en donde como ya hemos mencionado, los receptores se encuentran disminuidos. El daño específico en las fibras serotoninérgicas en el cerebro adulto por la 5-dihidroxitriptamina produce una aguda caída en los niveles de 5-HT, los cuales parecen ser reactivados por señales del desarrollo en el cerebro. No solamente son las fibras serotoninérgicas las encargadas de hacer germinar y expandir su territorio.

puesto que se ha visto que la estimulación del factor de crecimiento astrocítico por un agonista a 5-HT<sub>1A</sub> puede gobernarlo. La utilización de interrupciones de la vía serotoninérgica en determinados periodos del desarrollo, es una importante herramienta para la comprensión y tratamiento en procesos de envejecimiento cerebral (Azmitia y Whitaker-Azmitia, 1991).

En otros experimentos, se ha observado la regulación de los niveles estriatales de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) prodinorfina en la vía rafé-estriatal. Los péptidos derivados a partir de la proenkefalina y prodinorfina se sabe que se encuentran localizados en las proyecciones de neuronas estriatales. Usando hibridación del ácido nucleico in situ para investigar el posible papel de la inervación serotoninérgica en la regulación de la expresión de genes opioides, los niveles de RNAm proenkefalina y de RNAm prodinorfina fueron determinados en el estriado y núcleo acumbens de la rata. La destrucción del núcleo del rafé dorsal por microinyecciones de 5,7-dihidroxitriptamina, no afectó los niveles de RNAm proenkefalina en cualquier región. Sin embargo, los niveles de RNAm prodinorfina fueron reducidos significativamente en el núcleo acumbens medial y en el estriado mediocaudal. Estos resultados implican que la actividad de la vía serotoninérgica, media una tónica y selectiva intensificación de la expresión del gen prodinorfina en las células blanco estriatales. Esto contrastando con la supresión tónica de la expresión del gen proenkefalina mediado por la vía de dopamina mesoestriatal (Morris y col., 1988).

En esa misma línea de investigación se ha estudiado la regulación de la serotonina en la biosíntesis de la tachykinina (hormona precursora de la Substancia P). La neurotransmisión de la serotonina fue

alterada para estudiar su papel en la regulación de la biosíntesis de tachykininas en el estriado. El agotamiento de la 5-HT con un tratamiento subcrónico de p-clorofenilalanina (PCPA), disminuyó los niveles de RNAm preprotachykinina (PPT, la prohormona precursora de la SP). Contrariamente, se incrementaron los niveles extracelulares de 5-HT con zimelidina (un inhibidor de la recaptura de 5-HT) o clorgyline (un inhibidor de la monoaminoxidasa) dando como resultado el incremento en los niveles de RNAm PPT. Para determinar el papel que juegan los receptores 5-HT mediando los cambios en el RNAm PPT, los animales fueron tratados con el agonista a 5-HT<sub>2</sub> el (R)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano (R-DOI). Esta droga incrementó significativamente el RNAm PPT y la inmunoreactividad preferencial a SP en el estriado. Estos resultados en su conjunto indican que la biosíntesis estriatal de tachykinina es sensible a las alteraciones en la neurotransmisión de la 5-HT (Walker y col., 1991).

En 1983, Steindler y col., utilizando un método de doble marcado, en el cual combinó la inmunocitoquímica para la identificación de la serotonina y un marcador autorradiográfico axonal retrogrado con aglutinina de germen de trigo (WGA), N-acetil-<sup>3</sup>H. La permanencia, sensibilidad y distinción de los marcadores provee a través de lo arriba mencionado un medio valioso en la identificación del neurotransmisor en las proyecciones de neuronas en el sistema nervioso central. Las preparaciones combinadas que utilizaron inmunohistoquímica/autorradiografía seguida a la inyección de WGA, N-acetil-<sup>3</sup>H en el estriado de ratón, reveló un gran número de proyecciones neuronales serotoninérgicas y pocas proyecciones no serotoninérgicas rafé-estriado.

En otro tipo de experimentos, se ha observado una hiperinervación en el estriado por aferencias del raquí dorsal después del agotamiento de la dopamina cerebral por lesiones neonatales seguidas a la inyección intraventricular de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas, en donde se sabe incrementan los niveles estriatales de serotonina en adultos. Este tipo de lesiones incrementaron la inervación del estriado a través de neuronas serotoninérgicas de los núcleos del raquí dorsal. Esta hiperinervación se reveló con un incremento de 300% en el número de neuronas marcadas retrogradamente en los núcleos del raquí después de que se inyectó la peroxidasa de rábano dentro del estriado adulto. El grado de hiperinervación, se redujó agudamente cuando las lesiones que agotaron la serotonina cerebral se hicieron en animales adultos que habían recibido 6-OHDA como neonatos (Berger y col., 1985).

Por otra parte, en estudios efectuados en ratas, se ha encontrado la relación que guarda el raquí dorsal con el estriado utilizando los efectos de la clonidina, el piperoxane y la lesión en el núcleo locus coeruleus. Para evaluar la influencia de neuronas noradrenérgicas centrales sobre los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico, se examinaron los efectos de la clonidina, piperoxane y la 6-hidroxidopamina. Utilizando histoquímica fluorescente con cromatografía, se demostró que la clonidina aumenta preferencialmente la fluorescencia de la serotonina intracelular en el núcleo del raquí dorsal sin afectar a las células 5-HT en el núcleo del raquí medio. La clonidina también produce una disminución significativa de la fluorescencia extraperivascular de las catecolaminas (CA) en la misma región. El piperoxane en una dosis no tuvo efecto significativo antagonizando los efectos de clonidina sobre 5-HT y CA. Las lesiones con 6-hidroxido-



... dopamina del locus coeruleus produce un incremento similar de la fluorescencia en el rafe dorsal y disminuye la fluorescencia de CA en el rafe dorsal y medio. Bioquímicamente, la clonidina disminuyó cuando el piperoxane incrementó un ritmo de intercambio de 5-HT en la correspondiente región terminal del rafe dorsal; el estriado. Similarmente, el intercambio de dopamina fue también disminuido por la clonidina e incrementado por el piperoxane en el estriado. Estos efectos pueden ser mediados por proyecciones noradrenérgicas desde el locus coeruleus al rafe dorsal y la sustancia nigra. Estos resultados indican que los efectos de la clonidina sobre las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas son indirectamente mediados a través de la estimulación del receptor noradrenérgico (Geyer y Lee, 1984).

En otros experimentos, se ha encontrado una relación funcional entre la habenula lateral y la serotonina en el estriado. La presencia de una inervación dopaminérgica en la habenula lateral del gato y su posible papel en la modulación de la transmisión de la serotonina en el estriado fueron investigados en aproximaciones *in vitro* y *in vivo*. Se encontró una alta densidad en los sitios de unión a [ $^3$ H]espiroperidol en la habenula, similar a la afinidad para domperidona y apomorfina como la que se presenta en el estriado del gato. Por medio de la técnica que emplea la cánula "push-pull" se detectó en la habenula una liberación substancial de la [ $^3$ H]dopamina que continuamente es formada a partir de la [ $^3$ H]tirosina, en gatos anestesiados con halotano. Adicionalmente, en animales anestesiados con la implantación de las cánulas antes mencionadas, ubicadas en el estriado y la sustancia nigra habenular, aplicaciones de dopamina ( $10^{-7}$ M) redujeron la liberación de [ $^3$ H]5-HT en la sustancia nigra

pero no en el estriado. Este cambio se previno por la aplicación de domperidone a la habenula lateral o por el bloqueo de la transmisión GABAérgica (aplicación de picrotoxina  $10^{-5}M$ ) en el rafe dorsal. Estos resultados apoyan la explicación de que la vía habenula-rafe participa en la liberación de la serotonina en el estriado de gato e indica que la entrada dopaminérgica a la habenula lateral participa en tal control (Reisine y col., 1984), más adelante se detallarán estos mecanismos.

Por otra parte y como ya se comentó antes, ocurre un agotamiento casi total de la dopamina cerebral producida por lesiones en ratas de tres días de edad con la aplicación intraventricular de 6-hidroxidopamina lo cual condujo a un pronunciado incremento en la serotonina y el ácido 5-hidroxiindolacético de 1 a 8 meses después. Este efecto fue asociado con un incremento *in vitro* a una alta afinidad en la recaptura de 5-HT, sugiriendo que la proliferación de nuevas terminales serotoninérgicas ocurren dentro del estriado. Ninguno de los efectos antes señalados fue obtenido cuando se produjeron lesiones comparables en ratas adultas (Stachowiak y col., 1984).

En otro tipo de experimentos, se estudió la distribución de fibras nerviosas que contienen serotonina en el cuerpo estriado de la rata, gato y mono utilizando el método modificado de peroxidasa-anti peroxidasa con antisuero a serotonina sin tratamiento previo alguno. En el estriado de todas las especies mamíferas investigadas, las fibras inmunoreactivas, fueron diferentes tipos de fibras varicosas distribuidas en una fina malla. La concentración de estas fibras fue alta en el estriado ventral, medio y caudal. Especialmente en el área confinada al globo pálido, las fibras de serotonina fueron abundantes y arregladas compactamente a lo largo del núcleo, en esta

área en el mono, una cuantas fibras gruesas (tracto de fibras) fueron intermezcladas, ellas corrieron a lo largo de la lámina medular lateral. Tal tracto de fibras también fue observado fuera de la lámina media medular en la porción central del segmento pálido medio. El paleoestriado (globo pálido y núcleo entopeduncular) de la rata y el gato así como en el segmento pálido medio del mono fue difusamente inervado con fibras de serotonina compuestas de numerosas varicosidades y de finos segmentos intervaricosos, los cuales, en el segmento pálido lateral del mono la distribución de fibras es escasa y parcial (Mori y col., 1985).

Por otra parte en una revisión de la organización anatómica de las proyecciones ascendentes de serotonina, se ha mostrado que estas proyecciones axonales no son difusas, pero tienen un patrón intrincado y ordenado. Los núcleos del rafe dorsal y medio y el grupo de células B-9 tienen un solapamiento, pero tienen una proyección diferencial a todas partes del cerebro anterior. Mientras que la mayoría de las proyecciones del rafe son extensamente solapadas; la proyección del rafe dorsal es más copiosa a la corteza frontal y al estriado, mientras que el rafe medio predominantemente inerva hipocampo y septum. Pequeños grupos de células del rafe proyectan en un patrón de mosaico a múltiples y ampliamente distribuidas islas de corteza. No obstante, un vasto orden topográfico es preservado en las proyecciones ascendentes del rafe dorsal. En estos estudios se demostraron dos clases de axones serotoninérgicos terminales que difieren en su morfología, el origen celular, la distribución regional y la respuesta a drogas psicotrópicas. Los axones del rafe dorsal son extremadamente finos y altamente vulnerables a determinadas anfetaminas neurotóxicas, por ejemplo a la 3,4-metilenedioximetanfetam

mina. Los axones del rafe medio tienen grandes varicosidades y son resistentes a las drogas mencionadas anteriormente. Se concluye que existen dos proyecciones serotoninérgicas diferentes morfológica y funcionalmente a la corteza y estriado (Molliver, 1987).

Por otra parte, en experimentos en donde se utilizó autorradiografía de alta resolución, posterior a la administración de  $^3\text{H}$ -5-HT intraventricularmente e inmunohistoquímica en presencia de un anti-suero contra el conjugado 5-HT-glutaraldehído; se utilizaron paralelamente para investigar la fina e intrincada relación estructural de las varicosidades axonales 5-HT en el estriado de la rata adulta. Las varicosidades que marcaron la recaptura fueron examinadas en finas secciones únicamente a partir de un sector paraventricular del estriado, mientras que sus contrapartes inmunoteñidas, fueron revisadas en finas secciones seriadas en el mismo sector paraventricular más un sector estriatal dorsal. Las dos aproximaciones sometidas a prueba resultaron complementarias en relación a sus dimensiones varicosas, principales sinápsis y relaciones aposicionales (una sobre otra).

Los axones serotoninérgicos terminales fueron en términos generales pequeños y uniformemente teñidos en el estriado dorsal. Sus rasgos internos vistos por autorradiografía, incluyeron pequeñas vesículas pleomórficas con vesículas granulares grandes ocasionales y algunas mitocondrias. Las uniones terminales 5-HT desde ambos sectores estriatales, dorsal y paraventricular, son exclusivamente sinápticas y con igual frecuencia sobre espinas dendríticas o árbol dendrítico, casi siempre con diferenciación membranal asimétrica. La proporción de uniones varicosas, sin embargo, fue muy baja en las

series (inmunohistoquímicas) así como en las individuales (autorradiografía) en las secciones finas. Solamente del 10 al 13 % de las varicosidades 5-HT del estriado dorsal o paraventricular exhibieron una unión sináptica, en contraste con una incidencia de unión de un mínimo de 70% para varicosidades axonales elegidas al azar, mostradas similarmente en el neuropilo circundante. Las terminales axónicas serotoninérgicas, sean o no sinápticas, estaban estrechamente en aposición a la variedad de estructuras que comprenden la mayor parte de otros axones terminales, espinas dendríticas y ramificaciones, pero raramente al cuerpo neuronal. La sinápsis y la fación aposicional de la inmunotinción de las varicosidades 5-HT fueron similares para el estriado dorsal y paraventricular. En este contexto, es muy probable que los efectos de 5-HT en el estriado son ejercidos bajo una multiplicidad de sitios celulares blanco, en añadidura al restringido número de espinas dendríticas y contactos al árbol sináptico por este tipo de monoamina cerebral (Soghomonian y col., 1989; Lavoie y Parent, 1990; ver Descarries y col., 1992).

Por otro lado, se ha observado que la degeneración de neuronas en el sistema nervioso central esta asociada a cambios morfológicos. En observaciones previas hechas con microscopia de luz, se encontró una degeneración de las fibras inmunoreactivas a serotonina (IR) en el cerebro de ratas viejas. El estudio consistió en la comparación a un nivel ultraestructural de las fibras delgadas normales serotonin-IR y las fibras aberrantes varicosas hinchadas en el cerebro de ratas viejas. Los contornos aberrantes se incrementaron hasta un tamaño de 6 micras, las vesículas variaron en su tamaño y no se encontraron uniformemente redondas, se presentaron mitocondrias distorsionadas y estructuras vacuolares ocupadas por membranas como rasgo

común en aquellas fibras con contornos aberrantes. Estos cambios indicaron la presencia de un proceso degenerativo y dan una evidencia adicional que mientras que algunas fibras serotoninérgicas están preservadas conforme la edad avanza, otras fibras serotoninérgicas están degeneradas en el estriado de ratas viejas (Van Luijtelaar y col., 1991).

En otros experimentos se valoraron los efectos de la lesión en la vía nigroestriatal con lesiones de 6-hidroxidopamina. Los efectos de las lesiones de la vía nigroestriatal sobre la inervación serotoninérgica estriatal fue examinada usando inmunohistoquímica en ratas adultas. Un día después de lesionadas, un gran número de protuberancias y fibras teñidas densamente, inmunoreactivas a 5-HT aparecieron alrededor de la lesión, la cual se encontró completamente vacía de inmunoreactividad a 5-HT. Cuatro semanas después de lesionadas, se verificó una reducción significativa de la densidad de inervación a 5-HT en la porción ventral del estriado rostral y el estriado caudal del lado lesionado. Ocho semanas después de lesionadas, un decremento similar en la densidad de la inervación de 5-HT fue observado en el lado lesionado. Algunas fibras inmunoreactivas a 5-HT aberrantes, se encontraron alrededor de la lesión de la vía nigroestriatal. Estos resultados indican que lesiones con 6-hidroxidopamina en el haz nigroestriatal de la rata adulta, induce a una reducción en la densidad de la inervación serotoninérgica estriatal, así como la presencia de fibras aberrantes morfológicamente inmunoreactivas a 5-HT alrededor de la lesión (Takeuchi y col., 1991).

Por otra parte y para confirmar la relación anatómica de los núcleos del rafe y el estriado, utilizando microdiálisis en vivo en la rata, se examinó el efecto de la administración local de 8-OH-DPAT

en el interior de los núcleos del rafe dorsal (NRD) o en el medio (NRM) y el efecto sobre los niveles de serotonina en su correspondiente campo de proyección: estriado o hipocampo ventral. La inyección local de 8-OH-DPAT (0.5 ug/0.1 ul) en el NRD reduce los niveles extracelulares de 5-HT en el estriado (-55%) y en menor grado en el hipocampo (-22%). Cuando se inyectó la misma dosis en el NRM, la 8-OH-DPAT produjo una marcada disminución en los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo (-41%) y no tuvo efectos sobre el estriado. Los estudios de autorradiografía que se llevaron a cabo en animales que recibieron una inyección local de 8-OH-DPAT dentro del NRD o NRM bajo similares condiciones experimentales, indicaron que la radioactividad se localizó dentro de cada uno de los núcleos del rafe cerebrales. Estos resultados confirmaron anatómicamente que el estriado y el hipocampo ventral reciben su inervación serotoninérgica preferencialmente de los núcleos NRD y el NRM respectivamente (Bovento y col., 1992).

Para concluir esta parte, resulta interesante señalar que se ha encontrado una relación anatómica entre los axones serotoninérgicos y los receptores 5-HT<sub>2</sub> en el cerebro anterior de la rata. Estos estudios fueron determinados por análisis inmunohistoquímicos y autorradiográficos del receptor. Altas densidades del receptor 5-HT<sub>2</sub> localizados por uniones al ligando N1-metil-2-125I-LSD (125I-MIL) fueron encontrados en la neocortezas y en el estriado, regiones que se caracterizan por recibir una densa inervación serotoninérgica. La variación regional en la densidad de receptores 5-HT<sub>2</sub> y axones 5-HT se correspondió estrechamente en la mayoría, pero no en todas las áreas del cerebro anterior. En la corteza somatosensorial (SI), la

distribución laminar de los receptores 5-HT<sub>2</sub> está estrechamente apareada con axones 5-HT; en particular una densa banda de receptores 5-HT<sub>2</sub> en la capa Va de SI está en correspondencia con un denso plexo de finos axones de 5-HT. Se ha observado una relación espacial estrecha entre receptores 5-HT<sub>2</sub> y axones finos en otras áreas del cerebro anterior, sugiriendo que los receptores 5-HT<sub>2</sub> pueden estar selectivamente enlazados a un tipo particular de axon 5-HT terminal. Puesto que los axones finos de este tipo han sido reportados como provenientes de los núcleos del rafe dorsal, su presencia es que probablemente los receptores 5-HT<sub>2</sub> puedan mediar los efectos de las proyecciones del rafe dorsal pero no del rafe medio (Blue y col., 1988).



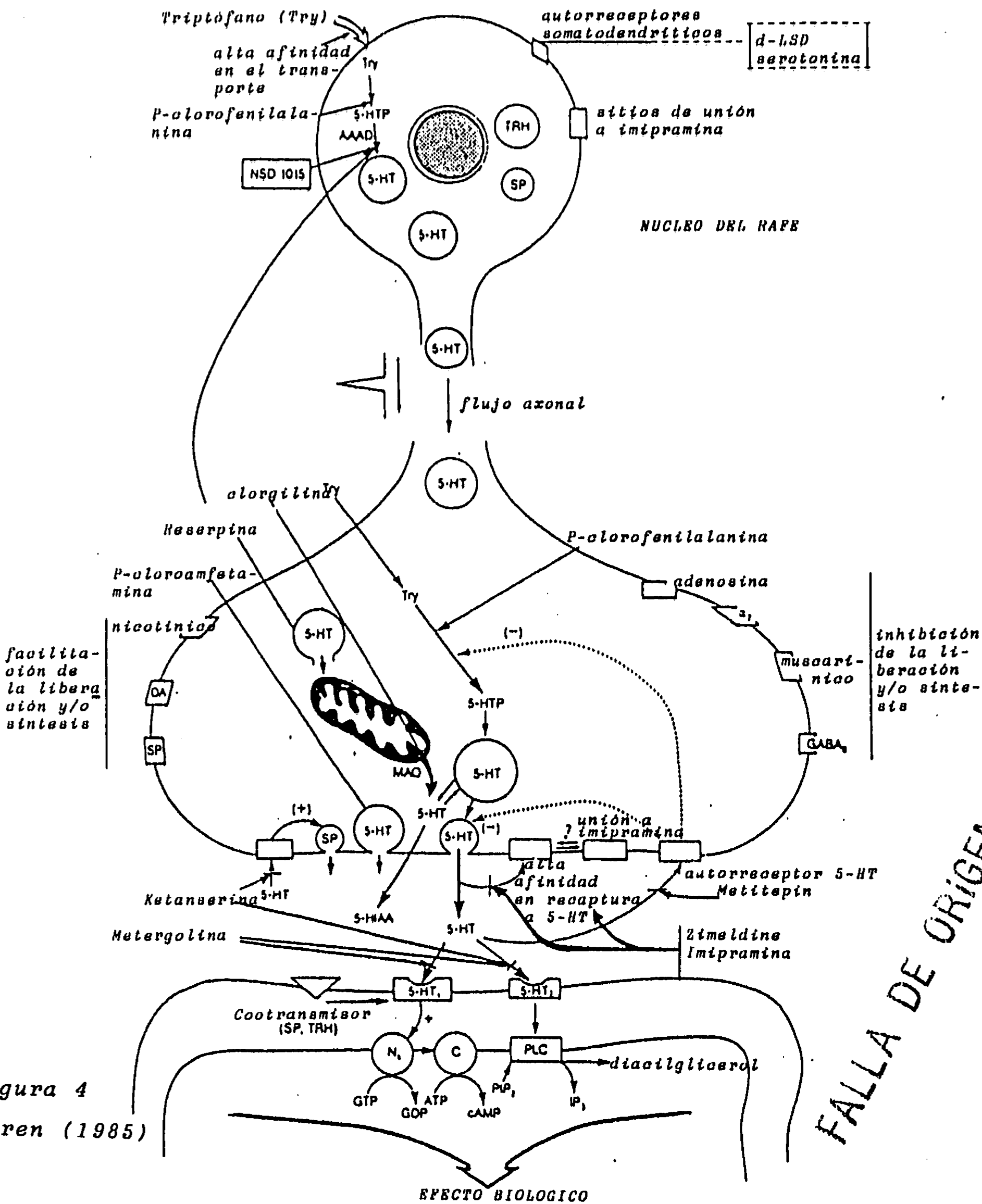
*Regulación y autorregulación de la vía serotoninérgica en el  
estriado*

*Evidencias experimentales*

En un estudio en el que se realizó una evaluación de retroalimentación autoinhibitoria de la liberación de la serotonina en el estriado de conejo, se encontró lo siguiente: Los cortes del estriado fueron preincubados con [ $^3$ H]serotonina en presencia de nomifensina; los cortes fueron perfundidos y estimulados eléctricamente por dos ocasiones. La liberación extracelular de 5-HT, fue inhibida en forma dependiente por la concentración de ligandos al receptor 5-HT, preferentemente a autorreceptores 5-HT<sub>1D</sub>. El inhibidor de la recaptura de 5-HT, la nitroquipazina cambió marcadamente la forma de la curva dosis-respuesta del agonista al autorreceptor, el 5-carboxamido-triptamina (5-COHT). El efecto máximo sobre la curva dosis-respuesta de 5-COHT y de la 5-HT extracelular llegó a ser más pronunciada en la presencia adicional del antagonista al autorreceptor 5-HT, el metitepin o la metergolina.

El análisis de regresión no lineal para estas curvas se usó para estimar el valor del  $pK_D$  de la 5-HT endógena (intracelular) y la concentración de 5-HT al autorreceptor, en la ausencia y presencia de 6-nitroquipazina y en la presencia adicional de metitepin o metergolina. Los resultados revelaron una función de retroalimentación autoinhibitoria, vía el tipo autorreceptor 5-HT<sub>1D</sub> en la liberación de 5-HT en el tejido (ver figura 4) desde el estriado. También, la inhibición por los agonistas alfa-2-adrenorreceptores, la clonidina y el UK-14,304 sobre la liberación de 5-HT fue dependiente de la concentración. No hubo ningún mejoramiento de la liberación por rauwols-

...cina que es un agonista al autorreceptor 5-HT y antagonista al alfa-2-adrenorreceptor, y en presencia de metitepin o por el antagonista alfa-adrenorreceptor, la fentolamina ( $10^{-6}M$ ) (Feurstein y col., 1992).



Por otra parte y utilizando la técnica que emplea la cánula "push-pull" y un método isotópico para estimar la  $|^3H|5-HT$  que continuamente se sintetizaba del  $|^3H|$ triptófano, fueron investigados los efectos en los cambios en la liberación de la serotonina en el núcleo del rafé dorsal sobre la liberación en vivo de la  $|^3H|$ serotonina en el estriado de gato. El incremento en la liberación de la 5-HT en el núcleo del rafé dorsal causado por la aplicación local de paraclorofenilalanina ( $10^{-6}M$ ), reduce la liberación estriatal de  $|^3H|$ serotonina. Esta inhibición de la liberación de serotonina en el estriado fue bloqueada por la perfusión previa local y continua en el rafé dorsal de metitepin ( $10^{-7}M$ ) que es antagonista al autorreceptor de serotonina. El GABA ( $5 \times 10^{-5}M$ ) aplicado en el rafé dorsal reduce la liberación local y en el estriado de  $|^3H|$ serotonina. Sin embargo, la picrotoxina ( $10^{-5}M$ ), un antagonista al receptor GABA aplicado localmente en el núcleo del rafé dorsal incrementó la liberación de  $|^3H|$ serotonina, mientras que redujo la liberación de  $|^3H|$ serotonina estriatal. Esta disminución en la liberación de la serotonina en el estriado fue nuevamente bloqueada por la perfusión continua en el núcleo del rafé con metitepin. Además, la perfusión de los cuerpos celulares serotoninérgicos de los núcleos del rafé dorsal con metitepin sólo, nunca alteró la liberación local o la liberación estriatal de  $|^3H|$ serotonina.

Estos datos apoyan fuertemente la sugerencia de que la liberación de serotonina desde el cuerpo celular en el núcleo del rafé dorsal, básicamente controlan la liberación de la amina en las terminaciones nerviosas axonales a través de autorreceptores serotoninérgicos localizados en los cuerpos celulares nerviosos serotoninérgicos en el núcleo del rafé dorsal (ver figuras 3 y 4). El origen de la libera-

...ción de la serotonina en el núcleo del rafe dorsal y la posibilidad de que este tipo de regulación pueda ser relacionada a cambios en la conducción del impulso nervioso en el sistema serotoninérgico rafe-estriatal tiene mucho de verdad (Becquet y col., 1990a).

Existen experimentos, en donde se evidencian en vivo la existencia de autorreceptores sobre las neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y colinérgicas en el cerebro de la rata: La infusión intraestriatal, así como la administración sistémica del antagonista selectivo a D2, el (-)sulpiride produjo un incremento similar en los niveles dializados de dopamina (DA) en un 180% respecto al control. Una conclusión similar se obtuvo, cuando el agonista selectivo a D2, el (-)-N-0437 fue aplicado intraestriatalmente o administrado sistémicamente, ambas vías de administración produjeron un decremento en la liberación de dopamina en cerca de un 40 a 50% con respecto al control. A fin de evaluar las propiedades en la modulación de la síntesis por los autorreceptores sobre las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas se estimó el grado de síntesis de la serotonina o dopamina monitoreando la formación de 5-HTP o DOPA en los dializados durante la infusión de un inhibidor de la descarboxilasa. La infusión de (-)-N-0437 disminuyó la formación de DOPA, mientras que la infusión de (-)-sulpiride incrementó los niveles dializados de DOPA; estos resultados indican que los receptores D2 que controlan la síntesis de DA, están localizados sobre las terminales nerviosas.

La administración de un agonista selectivo a 5-HT1A, el 8-OH-DPAT resultó con un decremento en la síntesis de 5-HT. Cuando el 8-OH-DPAT fue aplicado por la vía de la diálisis membranal, el agonista fue incapaz para modificar la liberación de 5-HT. El efecto de la administración del agonista muscarínico oxotremorina y del antagonis-

...ta muscarínico la atropina, tuvieron una dependencia en relación a la presencia del inhibidor de la esterasa, la neostigmina, en el fluido perfundido. En la ausencia de neostigmina, la oxotremorina produjo un pronunciado decremento en la liberación de la acetilcolina (ACh), mientras que la atropina no tuvo efecto. En presencia de neostigmina, la oxotremorina no tuvo efecto, pero la infusión de atropina u otro antiolinérgico produjo un pronunciado incremento en los niveles dializados de ACh. Con estos resultados probablemente los autorreceptores que controlan la liberación de ACh puedan ser tipo M3 y que el receptor no es ocupado completamente durante las condiciones normales. En conclusión, la microdiálisis de neurotransmisores es un instrumento valioso para el estudio de autorreceptores en vivo. En este estudio se dan evidencias sobre la existencia de autorreceptores y el control de la síntesis y/o liberación de DA, 5-HT, así como de la ACh en el estriado (Westerink y col., 1990).

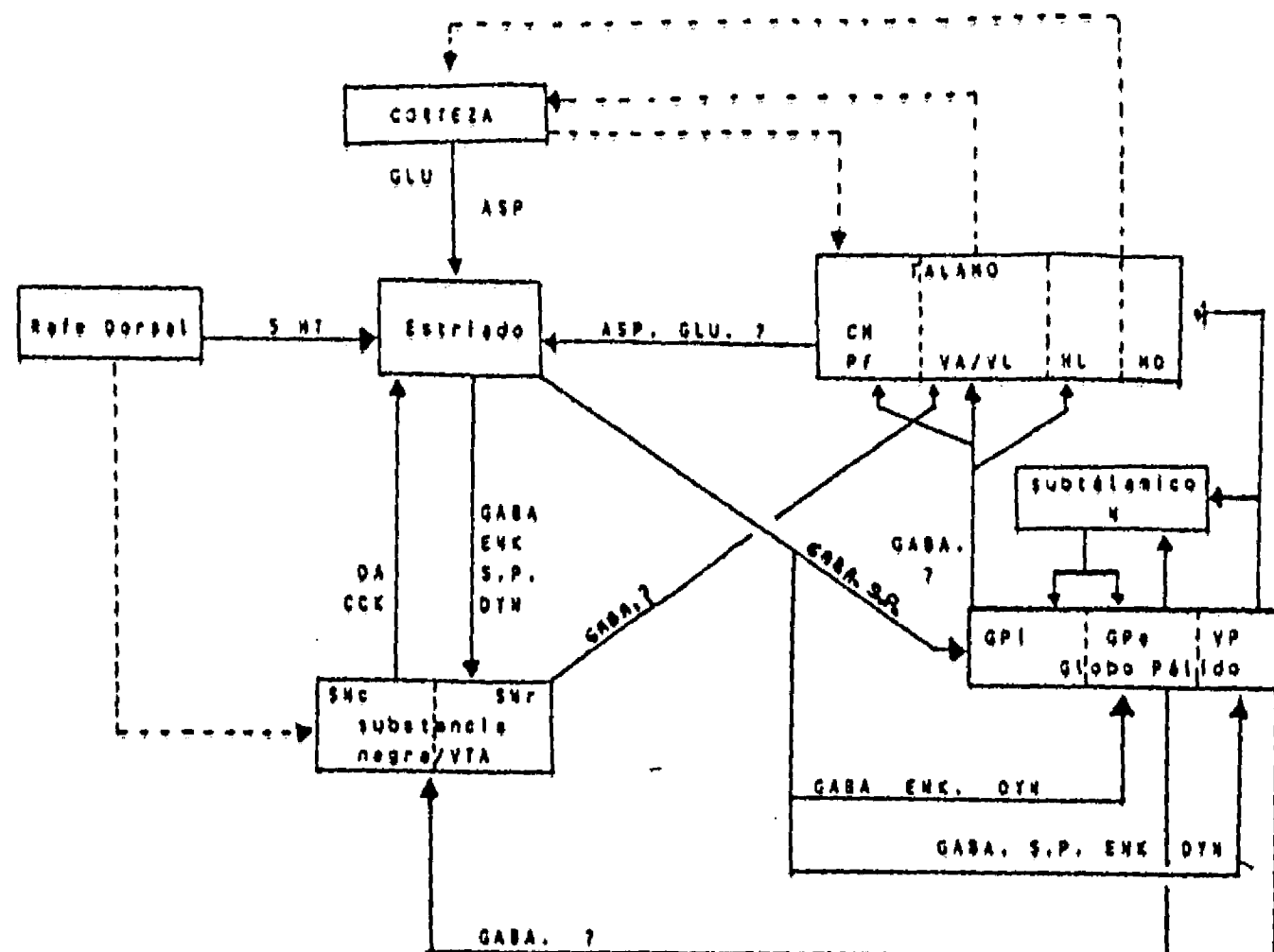
En otros experimentos, se ha estudiado la mediación colinérgica y GABAérgica en los efectos de la apomorfina (APO) sobre las neuronas serotoninérgicas. Como ya se ha demostrado, la APO eleva las concentraciones de triptófano, 5-HT y el 5-HIAA en el rafe dorsal (RD) y en su sitio de proyección el estriado, pero no en el rafe medio (RM) y su área terminal hipocampo. Estos efectos están mediados indirectamente a través de autorreceptores a DA en la sustancia nigra y posiblemente por neuronas GABAérgicas en o cerca del RD. En este estudio se encontró que los efectos de APO sobre neuronas 5-HT están también mediados por los receptores nicotínicos y muscarínicos colinérgicos, así como los receptores a GABA en el RD.

La sugerencia anterior se basa en el descubrimiento de que la atropina y la mecamilamina antagonizó los efectos APO, mientras que

el carbacol en una dosis alta ejerció el efecto opuesto que el APO. Además, la pirenzepina y la bicuculina a dosis bajas también antagonizaron, mientras que el saclorfe, no pudo alterar la influencia de APO sobre la 5-HT en el estriado. La bicuculina en dosis altas incrementa el triptófano y en gran parte a la 5-HT misma. Ninguna de las drogas estudiadas tuvo un efecto significativo sobre el triptófano, 5-HT o 5-HIAA en el hipocampo. Estos resultados sugieren que las neuronas de DA, ACh y GABA están involucradas en la acción de la APO sobre la 5-HT, mientras que la relación sináptica estrecha y directa entre estos neurotransmisores y su sitio anatómico preciso para que estas interacciones ocurran, aún se desconoce. Sin embargo, se puede esquematizar una relación amplia entre neurotransmisores como está representado en la figura 5, en donde el estriado juega un papel central. Es posible que la APO, por inhibir las descargas de las neuronas DA en la sustancia nigra y a través de mecanismos que involucren la desinhibición de GABA, indirectamente se pudieran activar neuronas 5-HT en el RD y estriado. Mientras tanto, y por encima de los modelos de descarga neuronal, el incremento simultáneo de triptófano y 5-HT, especialmente triptófano, se puede explicar más fácilmente por un mecanismo de recaptura de triptófano con la administración de APO. Como se ha visto, estudios adicionales, anatómicos, bioquímicos y electrofisiológicos han probado esta hipótesis y clarificado el circuito y los lugares anatómicos para que ocurran estas interacciones (Chen y col., 1992).

Por otra parte, en experimentos de tipo electrofisiológico, se estudió la actividad antidrómica en neuronas del núcleo del rafe desde el estriado. El estudio se efectuó en tres tipos de neuronas con descargas espontáneas y con respuestas a la estimulación estriatal,

localizadas en el rafe dorsal en ratas anestesiadas con uretano.



**Figura 5.** Conexiones de los ganglios basales, indicando los transmisores químicos, los cuales están identificados con sus vías particulares. Las líneas continuas indican algunas conexiones entre estructuras que no corresponden a los ganglios basales, las cuales se encuentran próximas al circuito del cuerpo estriado.

ASP-aspartato; CCK-colecistocinina; CM-centro medial; DA-dopamina; DYN-dinorfina; ENK-encefalina; 5HT-serotonina; GABA-ácido gama-aminobutírico; GLU-glutamato; GPe-segmento del globo pálido externo; GPi-segmento del globo pálido interno; HL-núcleo habenuar lateral; SNc-Substancia negra, pars compacta; SNr-substancia negra, pars reticular; S.P.-substancia P; VA/VL-ventral anterior/ventral lateral; VP-pálido ventral.

Haber (1986).

Dos de las tres neuronas fueron activadas desde el estriado, mismas que se consideraron del tipo serotoninérgico. Para probar lo anterior se estudio el cambio de la excitabilidad del campo terminal serotoninérgico en el estriado, seguido a la administración del agonista al autorreceptor serotoninérgico, el 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeODMT). La excitabilidad del campo terminal serotoninérgico fue disminuida por la inyección intravenosa de 40 ug/kg de 5-MeODMT, y por la infusión de 10 a 50 uM de 5-MeODMT directamente en el interior del estriado. Estos resultados pueden interpretarse en el sentido

**FALLA DE ORIGEN**

del papel que juegan los autorreceptores en la regulación de la liberación de la serotonina (Sawyer y col., 1985).

En otros experimentos, se estudió el efecto de la apomorfina sobre neuronas serotoninérgicas y la mediación de autorreceptores a dopamina. Se examinaron los efectos de la infusión directa de la apomorfina en el *rafé dorsal* y *substancia nigra*, además sus efectos sobre neuronas serotoninérgicas en ratas machos. Los resultados muestran que la infusión de apomorfina sobre el *rafé dorsal* no pudo producir un efecto significativo sobre las neuronas serotoninérgicas en el mismo *rafé dorsal* en relación a la 5-HT, el 5-HIAA o en su sitio de proyección al *estriado*.

La infusión directa de apomorfina en la *substancia nigra* imitó los efectos sistémicos de la apomorfina, a saber, incrementó la *fluorescencia de 5-HT* en el *rafé dorsal* e incrementó las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en el *estriado*. En las neuronas serotoninérgicas del *rafé medio* y en su sitio de proyección al *hipocampo* no hubo efecto alguno. Además, la inyección de *peroxidasa de rabano* en el *rafé dorsal*, resultó con un marcado celular específico en la *substancia nigra* y fibras marcadas en el *área tegmental ventral*.

El agonista selectivo al autorreceptor DA, el *3-3-hidroxifenil-N-n-propil-piperidine* imitó los efectos de la apomorfina sobre neuronas 5-HT. Estos resultados sugieren que los efectos de la apomorfina sobre el sistema serotoninérgico mesoestriatal está probablemente mediado a través de autorreceptores DA en la *substancia nigra* y posiblemente por una vía directa *substancia nigra-rafé* (Lee y Geyer, 1984).

Por otra parte y en esta misma línea, se ha observado el efecto de la estimulación del *núcleo talámico parafascicular* en la regulación de la transmisión serotoninérgica en el *estriado de gato*, en



donde se vió la participación de los autorreceptores en el núcleo del rafe dorsal. Los efectos de la estimulación unilateral del núcleo parafascioular sobre la liberación de la  $|3H|5-HT$  recientemente sintetizada, fueron simultáneamente determinados en el estriado ipsilateral y en el núcleo del rafe dorsal, usando cánulas "push-pull". La estimulación eléctrica o química del núcleo parafascioular induce a una disminución en la liberación de  $|3H|5-HT$  en el estriado e incrementa la liberación de  $|3H|5-HT$  en el núcleo del rafe dorsal.

El bloqueo de la transmisión colinérgica (mecamilamina) y glutamatérgica (PK 26124) a nivel del estriado no modificó el efecto inducido por la estimulación talámica sobre la liberación de serotonina en el estriado o en el núcleo del rafe dorsal. Sin embargo, el decremento en la liberación de la serotonina estriatal inducida por la estimulación del núcleo parafascioular no pudo ser observado cuando los autorreceptores presentes sobre los cuerpos celulares nerviosos serotoninérgicos en el núcleo del rafe dorsal, fueron bloqueados con la perfusión de metitepin dentro del núcleo. Estos resultados indican que el núcleo parafascioular, controla la transmisión serotoninérgica estriatal, al inducir cambios en la actividad nerviosa en las neuronas serotoninérgicas en el núcleo del rafe dorsal vía liberación de serotonina somatodendrítica, y autorreceptores (Becquet y col., 1989).

En otros experimentos, se estudió la evidencia en vivo del control inhibitorio glutamatérgico en la liberación de serotonina en el estriado de gatos con la implicación de neuronas GABA. El efecto local del ácido L-glutámico ( $5 \times 10^{-5} M$ ) sobre la liberación de  $|3H|5-HT$  continuamente sintetizada a partir de  $|3H|$ triptófano fue examinada en el estriado de gatos sin anestésiar con cánulas implantadas tipo

"push-pull". El ácido L-glutámico ( $5 \times 10^{-5} M$ ) disminuyó la liberación de la serotonina desde las terminaciones nerviosas de las neuronas rafé dorsal-estriado. El efecto fue antagonizado con 2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazole (PK 26124) a una dosis de ( $10^{-6} M$ ) un antagonista de la transmisión glutamatérgica. Este efecto (disminución de la liberación de serotonina) fue imitado por el ácido N-metoxi-D-aspartato (NMDA) ( $5 \times 10^{-5} M$ ) y prevenido por el ácido DL-2-fosfo-valérico (APV) ( $5 \times 10^{-6} M$ ). Estos resultados indican que el ácido L-glutámico disminuye la liberación de serotonina via un tipo de receptor a N-metoxi-D-aspartato.

La perfusión en terminales nerviosas de serotonina en el estriado con tetrodotoxina, previno el efecto inhibitorio inducido por el ácido L-glutámico sobre la liberación de la serotonina. Además la inhibición inducida por el ácido L-glutámico en la liberación de  $|3H|5-HT$  fue antagonizada por bicuculina ( $5 \times 10^{-5} M$ ). Estos datos sugieren que los receptores glutamatérgicos involucrados, estaban localizados directamente sobre las terminales nerviosas serotoninérgicas. El control inhibitorio ejercido por el ácido L-glutámico sobre la transmisión serotoninérgica pudo involucrar interneuronas del tipo ácido-gamma-aminobutírico. Puesto que no existió una reducción en la liberación espontánea de la  $|3H|5-HT$  en presencia de bicuculina. Las neuronas GABAérgicas parecen ejercer una influencia fásica sobre la liberación de serotonina. El control presináptico inhibitorio indirecto sobre la liberación de la serotonina mediado por fibras glutamatérgicas corticoestriatales está en discusión (Becquet y col., 1990b).

En otros experimentos se investigó la modulación del metabolismo de dopamina estriatal por la actividad de las aferencias serotoninérgicas del rafe dorsal. La interacción de la serotonina y dopamina fue estudiada en el estriado después de la estimulación eléctrica de rafe dorsal, en donde se encuentran los cuerpos celulares 5-HT y terminaciones aferentes a las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. El DR fue estimulado por medio de un electrodo bipolar de acero inoxidable por 16 minutos (10 Hz, 06 ms, 200 uA). El metabolismo de 5-HT y DA fue monitoreado antes, durante y después de la estimulación por un pulso diferencial voltamétrico en vivo. La técnica electroquímica usó electrodos de fibra de carbón implantados en áreas cerebrales para registrar el punto máximo de oxidación del ácido 5-hidroxiindolacético y del ácido dihidroxifenilacético extracelulares.

Los cambios en la concentración de los metabolitos fueron registrados cada dos minutos en ratas con libre movimiento. El 5-HIAA y el DOPAC se incrementaron en los primeros minutos después de llevarse a cabo la estimulación, el ascenso duro 30 minutos después de concluir la estimulación. El DR estuvo estrechamente involucrado, ya que cuando la estimulación se efectuó en áreas del alrededor no existieron cambios en los metabolitos. Las determinaciones bioquímicas clásicas en las muestras de tejidos se usaron para estudiar el efecto sobre la liberación de DA: los niveles de 3-metoxitiramina (3-MT), medidos en condiciones basales y después de bloquear su degradación con pargilina no fueron modificados, lo que indica que la estimulación del DR, si bien incrementa el metabolismo de DA, no afecta su liberación. Sin embargo, la modulación de la transmisión de DA por las aferencias 5-HT parece posible en ciertas circunstancias. Esta interacción 5-HT-DA parece ser presináptica (sobre terminales dopaminérgicas o

cuerpos celulares) dado que el efecto no se evitó por la degeneración de las neuronas estriatales con ácido kainico (De Simoni y col., 1987),

También se ha estudiado la influencia inhibitoria del GABA sobre la transmisión serotoninérgica central. El compromiso de las vías habenulo-rafé en la inhibición GABAérgica ascendente sobre las neuronas del estriado, hipocampo y sustancia nigra fue estudiado en las ratas.

Para explicar la naturaleza anatómica y funcional del control inhibitorio GABAérgico de las neuronas serotoninérgicas cerebrales a nivel de las células del rafé anterior en la rata, se estudió el efecto de agentes agonistas a GABA (dados sistémicamente o aplicados localmente dentro del núcleo del rafé dorsal o medio) sobre la acumulación cerebral de 5-hidroxitriptófano (5-HTP) después de lesiones o manipulaciones farmacológicas en diferentes entradas al rafé. La destrucción de la vía noradrenérgica por una inyección local de 6-hidroxidopamina en el pedúnculo cerebelar superior o por una inyección sistémica de DSP-4 (50 mg/kg i.p.), o por otra parte la alteración de la transmisión dopaminérgica central (por administración sistémica de apomorfina o haloperidol) no pudieron modificar la capacidad del progabide (400 mg/kg i.p.) o del dipropilacetamida (150 mg/kg i.p.) para disminuir la acumulación de 5-HTP en el estriado, hipocampo y sustancia nigra.

En contraste, la lesión electrolítica del núcleo habenular, bloqueó la capacidad de los compuestos (dados sistémicamente) para reducir la acumulación de 5-HTP en las áreas terminales nerviosas serotoninérgicas y en los cuerpos celulares (del rafé dorsal y medio). Un bloqueo similar de los efectos imitados del GABA fue visto des-

...pués de inducir una lesión de la habenula, pero no después de una lesión electrolítica de la estria medular (la cual lleva la mayoría de las aferencias a la habenula). La interrupción aguda del flujo de impulsos en el tracto habenula-rafé, también previno la disminución inducida por la depamida en la acumulación de 5-HTP. Finalmente, la interrupción de la transmisión nerviosa en la vía habenula-rafé (por medio de la lesión electrolítica de la habenula o el fascículo retroflexo) bloqueó la capacidad del GABA (100 ug) o de muscimol (50 ug) inyectados dentro del rafé dorsal o medio para reducir la acumulación de 5-HTP en la correspondiente área nerviosa serotoninérgica terminal. Se concluye que la inhibición GABAérgica de las neuronas serotoninérgicas ascendentes ejercida en el rafé dorsal y medio, depende de una actividad neuronal que cursa sobre la vía habenula-rafé. Se cree que el GABA ejerce un control inhibitorio en las neuronas serotoninérgicas, a través de una influencia originada en la habenula (Nishikawa y Scatton, 1985; ver Scatton y col., 1984; Reisine y col., 1984).

Anteriormente Nishikawa y Scatton (1983) con la administración sistémica de progabide, dipropilacetamida y gamma-acético-GABA, observaron que disminuyó la acumulación estriatal de 5-HTP; el efecto del progabide fue abolido después de la hemisección de la vía habenula-rafé. La administración de GABA o de agonistas a GABA en el rafé dorsal (pero no intraestriatal), redujo la acumulación estriatal de 5-HTP. La infusión de picrotoxina o bicuculina dentro del rafé dorsal no tuvo efecto. Con esto concluyeron que el GABA ejerce una influencia inhibitoria sobre la transmisión serotoninérgica estriatal vía la estimulación de receptores de GABA localizado en el rafé dorsal.

En esta misma línea, se efectuaron lesiones bilaterales del núcleo habenular por electrocoagulación o por la inyección local de ibotenato, antagonizando la capacidad de los agentes agonistas a GABA, el progabide y depamide (dados sistémicamente) o de GABA (aplicado localmente dentro del rafe dorsal) para disminuir la acumulación de 5-HTP en el estriado de la rata. Similarmente, la interrupción del flujo de impulsos en el tracto habenula-rafe previno la reducción estriatal de la síntesis de serotonina, causada por la administración sistémica de las drogas agonistas a GABA. Estos datos sugieren que la inhibición GABAérgica en la transmisión serotoninérgica estriatal ejercida en el rafe dorsal depende de la vía habenula-rafe (Nishikawa y Soatton, 1984).

Por otra parte, se ha visto el papel de la vía dopaminérgica nigroestriatal en la depresión inducida por metanfetamina (MA) en el sistema serotoninérgico estriatal. La prevención de la disminución de la actividad de la enzima triptófano-hidroxilasa en el estriado con una sola dosis de metanfetamina fue probada con la lesión de las proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales con una inyección bilateral en la sustancia nigra de 6-OHDA. Las ratas fueron inyectadas con MA (10 mg/kg) 11 días más tarde, y sacrificadas 3 horas después de la inyección. La lesión con 6-OHDA previno la disminución de la actividad de triptófano-hidroxilasa (THP) en el estriado. Mientras que la disminución de la actividad de THP fue ligeramente atenuada en el hipocampo y no tuvo efectos en la corteza frontal. Se demostró que la atenuación de la actividad de THP puede ser prevenida en una área selecta cerebral al destruir sus aferentes dopaminérgicos, e implicar a la dopamina central o su metabolito, en la disminución de la actividad central de THP observada después de una sola inyección de metanfetamina (Johnson y col., 1987).

En relación a experimentos en los que se ha estudiado el papel que juegan los opiodes tenemos que, en investigaciones electroquímicas en vivo, se estudió la liberación estriatal de dopamina y serotonina por la morfina. El estudio se efectuó en ratas machos adultas. La administración intraperitoneal de la morfina produce un efecto bifásico sobre la liberación de dopamina estriatal. Un incremento significativo en la señal de la dopamina fue visto en la primera hora después de la administración de la droga; una disminución significativa en la señal de dopamina fue vista en la segunda y tercera horas después de la administración de la droga. En cuanto a la serotonina, la morfina tiene un efecto monofásico en la liberación de la serotonina estriatal. La morfina incrementó significativamente la liberación de la serotonina en el estriado de la rata. El efecto tardó tres horas después de la administración y persistió significativamente en todo el estudio (Broderick, 1985).

En esa línea, Spampinato y col. (1985) encontraron que la administración subcutánea de 10 mg/kg de morfina en ratas, aumentó significativamente los niveles de 5-HIAA en el diencéfalo, estriado, núcleo acumbens y corteza. Cambios similares en el metabolismo de 5-HT fueron encontrados en animales inyectados con 5 ug/0.5 ul de morfina en el raquí dorsal, mientras que la morfina inyectada en el raquí medio, elevó los niveles 5-HIAA solamente en el núcleo acumbens. El tratamiento previo con p-clorofenilalanina, un inhibidor en la síntesis de serotonina, redujo significativamente el efecto de la morfina inyectada en el raquí dorsal o el metabolismo de la dopamina en el estriado y en el núcleo acumbens. Los resultados sugieren que el principal mecanismo por el cual la morfina incrementa el metabolismo de 5-HT en el cerebro anterior de la rata, es por la activación de las células 5-HT en el núcleo del raquí dorsal, y esta acción puede con-

...tribuir al incremento en el metabolismo de dopamina encontrado en el animal inyectado con morfina en esta área cerebral.

Por otra parte y estudiando la influencia noradrenérgica en el estriado, se investigaron los efectos de la clonidina, piperonane y de la lesión del locus coeruleus sobre los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en los núcleos del rafé y en el estriado. Utilizando histoquímica fluorescente cuantitativa y cromatografía líquida de alta presión, se demostró que la clonidina (con mucha semejanza a la apomorfina), preferencialmente aumentó la fluorescencia de la serotonina en el núcleo del rafé dorsal sin afectar a las células 5-HT en el núcleo del rafé medio. La clonidina también produce una disminución significativa de la fluorescencia de las catecolaminas (CA) en el núcleo del rafé dorsal.

El piperoxane en una sola dosis no tuvo por sí mismo un efecto significativo, pero antagonizó los efectos de clonidine sobre 5-HT y CA. Las lesiones con 6-hidroxidopamina en el locus coeruleus produce un incremento similar en la fluorescencia de 5-HT en el rafé dorsal y disminuye la fluorescencia de CA en el rafé dorsal y medio. Bioquímicamente la clonidina disminuye, mientras que el piperoxane aumenta, el ritmo de intercambio de 5-HT en la región terminal correspondiente del rafé dorsal y el estriado. Similarmente, el intercambio de dopamina fue también disminuido por la clonidina y aumentado por el piperoxane en el estriado. Estos efectos pueden estar mediados por proyecciones noradrenérgicas desde el locus coeruleus para el rafé dorsal y la sustancia nigra. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los efectos de la clonidina sobre neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas, están indirectamente mediados a través de la estimulación del receptor noradrenérgico (Geyer y Lee, 1984).



En otros experimentos, se utilizó un pulso diferencial voltamétrico en vivo en ratas, para determinar el efecto de la liberación de la hormona tirotrópica (THR) sobre la actividad sináptica dopaminérgica y serotoninérgica en el estriado y núcleo acumbens. Se encontró que la liberación de THR produce efectos marcados estimulatorios en el comportamiento, los cuales han sido atribuidos a la liberación de dopamina en el núcleo acumbens. Se evaluaron los efectos de la THR sobre el contenido extracelular de los metabolitos de la dopamina y serotonina en el estriado y núcleo acumbens. La THR rápidamente incrementó el DOPAC extracelular, alcanzando un máximo después de 60 minutos en el núcleo acumbens y después de 40 minutos en el estriado. También se presentó un lento incremento en el contenido extracelular de 5-HIAA en ambas estructuras, alcanzando una meseta después de 100 minutos. El retardo en el curso del tiempo en cuanto a el contenido extracelular de 5-HIAA puede ser secundario al incremento en el cambio de la dopamina producido por la THR. Estos resultados sugieren que la THR, incrementa la liberación de dopamina y serotonina en el núcleo acumbens y en el estriado (Crespi y col., 1986; ver Crespi, 1986).

Existe una importante relación entre la serotonina estriatal y la acetilcolina, en esta sección sólo se presentarán resultados experimentales bioquímicos y funcionales, para que posteriormente y en lo que corresponde a los antecedentes relevantes para la formulación de las hipótesis; se vea toda la parte conductual que incluye la participación colinérgica y serotoninérgica en procesos de memoria.

A continuación se señalan los resultados experimentales, que apoyan fuertemente las consideraciones hipotéticas que sirvieron de referencia para nuestro trabajo de investigación.

Se investigó la influencia del tratamiento crónico con clorimipramina sobre la modulación de la serotonina en la liberación de la acetilcolina, en cortes de estriado en el puerco de guinea. La influencia del tratamiento crónico de clorimipramina (10 mg/kg diariamente s.c. por 14 días) sobre la modulación de 5-HT a partir del "derrame" (ver página 18) basal de  $^3\text{H}$  colina en cortes del estriado, dió por resultado lo siguiente: incremento del "derrame" basal de tritio inducido por la 5-HT (3-100  $\mu\text{mol/l}$ ) o por el agonista a 5-HT<sub>2</sub>, el (R)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano (R-DOI) (30-100  $\mu\text{mol/l}$ ) en los cortes normales y fue significativamente bajo en los que recibieron el tratamiento crónico con clorimipramina (CCT). Cuando se agregó tetrodotoxina (0.5  $\mu\text{mol/l}$ ), el efecto facilitatorio por 5-HT fue cancelado, el efecto inhibitorio posterior llegó a ser más evidente en el mismo grado en los cortes normales y los de CCT. Esta inhibición fue cancelada al agregar ICS 205-930 (antagonista al receptor 5-HT<sub>3</sub>, cuando se usa sólo reduce la liberación de  $^3\text{H}$  GABA causada por 23 nM  $\text{K}^+$ ; ver Meyer y col., 1991) a una dosis de 30  $\mu\text{mol/l}$ . Estos resultados indican que la respuesta facilitadora mediada por los receptores 5-HT<sub>2</sub> en las neuronas colinérgicas intraestriatales a 5-HT es reducida por CCT, mientras que la respuesta inhibitoria no es afectada (Siniscalchi y col., 1990).

En esta misma línea, usando la técnica con la cánula "push-pull" y un método isotópico para la estimación de la  $^3\text{H}$  serotonina sintetizada continuamente a partir de  $^3\text{H}$  triptófano, se investigó el efecto de la acetilcolina sobre la liberación en vivo de la  $^3\text{H}$  serotonina en el estriado y en el núcleo del rafé dorsal del gato. La aplicación estriatal unilateral de acetilcolina ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) reduce la liberación local de  $^3\text{H}$  serotonina. Este efecto fue imitado por

la nicotina ( $5 \times 10^{-5} M$ ) y prevenido por mecamilamina ( $10^{-6} M$ ). La oxotremorina ( $5 \times 10^{-5} M$ ) no tuvo efecto sobre la liberación local de  $|3H|$ serotonina. Estos tratamientos no pudieron modificar la liberación de  $|3H|$ serotonina en la sustancia nigra ipsilateral o en el núcleo del rafe dorsal. La perfusión de las terminales nerviosas serotoninérgicas del estriado con tetrodotoxina bloquea el efecto inhibitorio inducido por la acetilcolina sobre la liberación de la serotonina. Además, la bicuculina ( $5 \times 10^{-5} M$ ) en el estriado, bloqueó el efecto de la nicotina, mientras que el ácido gamma-aminobutírico ( $10^{-5} M$ ) indujo una disminución en la liberación de la  $|3H|$ serotonina. Estos resultados apoyan fuertemente la tesis de que el control inhibitorio ejercido por la acetilcolina sobre la transmisión de la serotonina puede involucrar interneuronas ácido-gamma-aminobutírico. Los cambios inducidos por la acetilcolina en la liberación de  $|3H|$ serotonina fueron solamente observados en "encéfalos aislados" de gatos no anestesiados y en animales anestesiados con halotano. Está en discusión la posibilidad de que tal regulación pueda ser presináptica (directa o a través de otro neurotransmisor) o relacionada a cambios en la actividad del sistema serotoninérgico rafe-estriatal (Becquet y col., 1988).

Por otra parte se ha visto en estudios en los cuales se determinó el grado de intercambio de la acetilcolina y la actividad de la colina acetiltransferasa en el núcleo acumbens y el estriado en ratas, que mientras la apomorfina y el agonista a la serotonina, el MK 212, fueron capaces de disminuir el grado de intercambio de la acetilcolina, el haloperidol mostró el efecto opuesto sobre el grado de intercambio de acetilcolina. Se concluye que en el núcleo acumbens y en el estriado, las interneuronas colinérgicas parecen ser moduladas

por los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico en una forma inhibitoria; en este mismo estudio, se observó que los agonistas a dopamina y serotonina inducen una depresión de la actividad enzimática, pero este efecto fue menos pronunciado que el efecto sobre el grado de intercambio de acetilcolina (Bluth y col., 1985).

En esta misma línea, el diisopropilfluorofosfato (81.5 nmol) fue inyectado directamente dentro del estriado de ratas para estudiar los cambios en el metabolismo estriatal de ACh, DA y 5-HT; señalados a tiempos iniciales seguidos a una inhibición aguda e irreversible de la colinesterasa. Veinte minutos después de la inyección intraestriatal de diisopropilfluorofosfato, los niveles de la acetilcolina estriatal se elevaron en un 50%, pero se presentó una disminución en la constante de disociación (intercambio: K<sub>ACh</sub>) compensado al cambio presentado. A una hora, los niveles de ACh fueron no obstante elevados, pero no significativamente diferentes de los valores control. Sin embargo, la K<sub>ACh</sub> y por lo tanto, el intercambio de ACh se incrementaron grandemente en este tiempo. Finalmente, a las 24 horas el contenido estriatal de ACh se elevó ligeramente y la K<sub>ACh</sub> y el grado de intercambio de ACh habían retornado a los valores controles. La actividad estriatal de la colinesterasa permaneció significativamente inhibida en los tres tiempos. En ninguno de esos tiempos el contenido de ACh o el intercambio fue afectado en la corteza parietal, hipocampo, hipotálamo o médula. Ni la dopamina y sus metabolitos fueron significativamente afectados, lo mismo ocurrió con la serotonina y sus metabolitos en los tres tiempos cuando se aplicó el tratamiento con diisopropilfluorofosfato (Robinson y col., 1986).

En otros estudios se consideró que la serotonina inhibe la liberación de la acetilcolina en cortes de estriado de ratas, dándose evidencias para explicar un efecto mediado por un receptor presináptico. Cortes de estriado cerebral de ratas fueron incubados con [ $^3$ H]colina, perfundidos con un buffer (amortiguador) fisiológico, y estimulados a través de perfusión con un buffer enriquecido con  $K^+$  por dos minutos. El "derrame" de tritio provocado por el  $K^+$  fue disminuido por serotonina (máxima inhibición  $10^{-6}M$ ). Este efecto de la 5-HT fue imitado por diversos agonistas (5-metoxitriptamina, N,N-dimetil-triptamina, bufotenin) y bloqueado por antagonistas serotoninérgicos (metitepin, metisergide, cinanserin) pero no por haloperidol; el metitepin y metisergide únicamente incrementaron ligeramente el "derrame" de tritio provocado por el  $K^+$ . La inhibición de la liberación del tritio por 5-HT no fue suprimida en la presencia de tetrodotoxina ( $10^{-6}M$ ). Estos resultados sugieren que la 5-HT inhibe tónicamente la liberación de acetilcolina en las neuronas colinérgicas estriatales por actuar sobre un receptor presináptico localizado sobre terminales colinérgicas (Gillet y col., 1985).

En otros experimentos, se observó la inhibición de la liberación estriatal de acetilcolina por la serotonina y la dopamina, después de la administración intracerebral de 6-hidroxidopamina en ratas neonatales. La administración intraventricular de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) agotó la dopamina del estriado. La toxina también incrementó el contenido estriatal de serotonina. Se ha observado que la serotonina endógena, del mismo modo que la DA, ejerce una influencia inhibitoria sobre la liberación de la acetilcolina a partir de cortes estriatales preparados en animales control; el grado de esta inhibición está relacionado al grado de la inervación serotoninérgica

de la región que llegue a ser examinada.

Para determinar si la hiperinervación serotoninérgica se acompaña por un incremento de la influencia serotoninérgica sobre la liberación de la acetilcolina (ACh), cortes estriatales de ratas adultas fueron preincubados con  $^3\text{H}$  colina, perfundidos y expuestos a estimulación de campo eléctrico. El eflujo de tritio en la perfusión se uso como medida de la liberación de ACh. Como se ha reportado anteriormente, los agonistas directos o indirectos de DA y 5-HT disminuyen el "derrame" de ACh en los cortes control, mientras que el "derrame" se ve incrementado por los antagonistas a estas aminas. En contraste a lo reportado anteriormente; el "derrame" de ACh a partir de cortes preparados de animales lesionados con 6-OHDA como neonatos, no se modificó por la aplicación de drogas serotoninérgicas o dopaminérgicas. Estos resultados sugieren que la hiperinervación serotoninérgica del estriado producida por la aplicación de 6-OHDA neonatalmente es acompañada por una pérdida de la influencia inhibitoria de la 5-HT y DA endógena sobre la liberación de la ACh (Jackson y col., 1988a).

En esta misma línea, se examinó la hipótesis de que la serotonina endógena ejerce una influencia inhibitoria sobre la liberación de la acetilcolina en el estriado. Se estudiaron cortes estriatales de ratas adultas, preincubadas con  $^3\text{H}$  colina, perfundidas y expuestas a estimulación de campo eléctrico. La estimulación indujo "derrame" de tritio en la perfusión que fue usada como una medida de la liberación de la ACh. Se observó que el fluoxetine, un inhibidor de la recaptura de 5-HT, reduce el "derrame" de ACh en cortes preparados del estriado caudal, un área con alta concentración de 5-HT, pero no en cortes del estriado rostral, una área de baja concentración de 5-HT. Además, la metisergida, un antagonista a 5-HT, incremento el eflujo

en el estriado caudal pero no en el rostral. Finalmente, la activación directa de receptores a 5-HT con un agonista serotoninérgico el quipazine, inhibió la estimulación inducida del "derrame" de ACh en el estriado rostral y caudal. Estos resultados sugieren que normalmente la 5-HT endógena es capaz de inhibir la liberación estriatal de ACh y que el grado de modulación está relacionado al grado de la inervación serotoninérgica. En síntesis, los receptores 5-HT capaces de modular la liberación de ACh están presentes en menores cantidades en el estriado rostral y en mayores proporciones en el estriado caudal (Jackson y col., 1988b).

En esta última parte, que corresponde a mecanismos de regulación en el capítulo; se presentará ahora, las evidencias experimentales de la importancia funcional que tienen los receptores.

Se han efectuado experimentos en los que se estudió que los antagonistas a 5-HT<sub>2</sub> y el minaprine bloquean la inhibición inducida por 5-HT en la liberación de dopamina a partir de cortes estriatales cerebrales. La serotonina inhibe la liberación de [<sup>3</sup>H]dopamina inducida por K<sup>+</sup> en los cortes del estriado de ratas. El minaprine (5-[2-morfolinoetilamino]-4-metil-6-fenilpirizadine) atenuó el efecto inhibitorio de 5-HT en una forma dosis-dependiente. Los antagonistas a 5-HT<sub>2</sub>, la ketanserina y mianserina, previnieron el efecto de la 5-HT, asimismo como el que tuvo el minaprine. El efecto inhibitorio de 5-HT no fue imitado por el agonista al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, el 8-OH-DPAT y no fue prevenido por el propanolol, antagonista a la mezcla de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub>. El minaprine fue un potente inhibidor de la unión de [<sup>3</sup>H]ketanserina a los sitios de unión en el estriado bajo un rango de concentraciones de 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-4</sup>M. La lesión del haz medio del cerebro anterior con 6-OHDA redujo significativamente la liberación

de  $^3\text{H}$ DA inducida por el  $\text{K}^+$  en el estriado y la liberación ya no fue inhibida por la 5-HT. En las lesiones, sin embargo, no hubo cambios significativos en las uniones  $^3\text{H}$ ketanserina en el estriado.

Estos resultados sugieren que la minaprine suprimió el efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la liberación de DA en el estriado vía la inhibición de uniones a 5-HT a el receptor 5-HT<sub>2</sub> sobre la terminal nerviosa de las neuronas dopaminérgicas y, además, que la proporción de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, sitio que se localiza sobre la terminal nerviosa de las neuronas dopaminérgicas es pequeño en el estriado (Muramatsu y col., 1988)

En otros experimentos se ha encontrado la potenciación mediada por el receptor 5-HT<sub>2</sub> en la síntesis de dopamina y en el déficit serotoninérgico central. La hipótesis fue probar que la serotonina modula el incremento en la síntesis de dopamina inducido por el 3,4-metilenedioximetamfetamina (MDMA). Las ratas fueron tratadas con el agonista selectivo al receptor 5-HT<sub>2</sub>, el (R)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano (R-DOI), el agente liberador selectivo a serotonina, el 5-metoxi-6-metil-2-aminoidan (MMAI), seguido por L-dihidroxifenilalanina (DOPA) y el inhibidor de la descarboxilasa el 3-hidroxibenzihidrazina (NSD-1015). Las ratas se sacrificaron 45 minutos después de la primera inyección determinándose la DOPA estriatal.

El R-DOI, el MMAI o la anfetamina por sí mismos no incrementaron significativamente la acumulación de DOPA. Sin embargo, la combinación de anfetamina con MMAI o R-DOI incrementaron significativamente la acumulación de DOPA. Dosis múltiples de la combinación de R-DOI y anfetamina no pudieron disminuir los sitios de unión a  $^3\text{H}$ paroxetine una semana después de sacrificadas. Los resultados indican que el efecto de incrementar la síntesis de dopamina por el MDMA dependen tanto



de la estimulación del receptor 5-HT<sub>2</sub> como del eflujo de dopamina (Huang y Nichol, 1993).

En otros experimentos se ha observado que el bloqueo de los receptores estriatales 5-HT<sub>2</sub> reduce el incremento de las concentraciones extracelulares de dopamina producida por el MDMA. Los antagonistas al receptor 5-HT<sub>2</sub> han mostrado que interfieren con la estimulación de la síntesis estriatal de DA y la liberación producida por el MDMA. Para localizar los receptores responsables en la atenuación de la liberación inducida por MDMA, antagonistas a receptores 5-HT<sub>2</sub> se aplicaron directamente por microdálisis en el cerebro de ratas despiertas con movimientos libres, antes de la administración sistémica de MDMA.

Las infusiones intraestriatales de los antagonistas selectivos a 5-HT, el MDL 100, 907 produce una inhibición dependiente de la concentración de la liberación de la dopamina inducida por MDMA. Resultados similares fueron observados con infusiones intraestriatales del antagonista a 5-HT<sub>2</sub>, el amperozide. En contraste, la infusión de MDL 100, 907 en la región media cerebral, próxima a los cuerpos celulares dopaminérgicos no tuvo efecto sobre el incremento de la dopamina extracelular en el estriado ipsilateral inducido por MDMA.

Ningún antagonista atenuó la transmisión del eflujo basal ni la liberación estimulada por MDMA de la [<sup>3</sup>H]dopamina en los cortes estriatales en vitro, indicando que el efecto en vivo de los antagonistas no fue debido a la inhibición del transportador de la recaptura de dopamina. La infusión intraestriatal de tetrodotoxina reduce a ambos: al eflujo basal de dopamina y al estimulado por MDMA y además eliminó el efecto del MDL 100,907 intraestriatal. Los resultados indican que los receptores 5-HT<sub>2</sub> localizados en el estriado aumentan la liberación de la dopamina producida por altas dosis de MDMA. Además,

estos receptores 5-HT<sub>2</sub> parecen estar localizados sobre elementos dopaminérgicos en el estriado (Schmidt y col., 1994).

Por otra parte se realizaron experimentos en los que se observó, que la destrucción neonatal de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales por la inyección intraventricular de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) dio por resultado, como ya hemos comentado, una hiperinervación de serotonina en el estriado rostral de la rata adulta.

La autorradiografía cuantitativa con uniones al ligando, fue usada para comparar la densidad de varios subtipos de receptores a 5-HT en el cerebro adulto en controles y ratas lesionadas con 6-OHDA. Los sitios 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1</sub> noAB y 5-HT<sub>2</sub> fueron marcados con <sup>3</sup>H|8-OH-DPAT, <sup>125</sup>I|cyanopindolol, <sup>3</sup>H|5-HT y <sup>125</sup>I|DOI, respectivamente; medidos en las mitades rostral y caudal del estriado y seleccionados de regiones del cerebro anterior o medio. Las uniones 5-HT<sub>1A</sub>, medidas después de seis meses, fue sin cambios en todas las regiones examinadas incluyendo los núcleos del rafe. Tres meses después de la lesión, las uniones 5-HT<sub>1B</sub> se incrementaron en todas partes del estriado (30%), pero también en la sustancia nigra (50%) y en el globo pálido (30%); sugiriendo una regulación e incremento en el transporte axonal de estos receptores en las proyecciones a neuronas estriatales.

Las uniones a 5-HT<sub>1</sub> noAB se incrementaron también en todas partes del estriado (40%) y en la sustancia nigra (50%), pero sin cambios en el globo pálido, como si ésta regulación preferencialmente involucrará la vía nigra-estriado y no a neuronas pálido-estriado. Las uniones a 5-HT<sub>2</sub> mostraron un gran incremento (60%), el cual fue restringido a la mitad rostral del estriado a las que se les atribuye funciones de regulación como heterorreceptores. Aunque las causas exactas del incremento de estos receptores no pudieron ser determinadas, su

distribución anatómica sugiere que ellos fueron de algún modo relacionados a la denervación inicial de dopamina en el caso de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>noAB</sub>; y más firmemente enlazados a la hiperinervación los receptores 5-HT<sub>2</sub>. Tales cambios en los receptores pudieron participar en los mecanismos adaptativos, implicando a otros transmisores y desordenes en el comportamiento en este particular modelo experimental.

Es interesante resaltar que pudieron también acontecer para el engrandecimiento y mejoramiento de la función 5-HT estriatal igual que a una condición en donde los niveles extracelulares de 5-HT aparentemente quedaron normales a causa del incremento de la recaptura (Radja y col., 1993). Por otra parte, se realizaron estudios experimentales en los que se trató de probar si los efectos del 8-OH-DPAT sobre la neuroquímica cerebral de la 5-HT en vivo, esta mediando la vía de autorreceptores a 5-HT sobre los cuerpos celulares o sobre las terminales y/o vía receptores 5-HT postsinápticos. Se determinó en vivo los índices de la síntesis y los grados de liberación/intercambio de 5-HT en proyecciones neuronales prominentes a 5-HT en áreas del SNC:

- 1.- Después de la administración sistémica de 8-OH-DPAT en ratas a las que se les seccionó los axones en forma aguda y unilateral de las neuronas monoaminérgicas mesencéfalicas ascendentes, o
- 2.- Después de la infusión local del 8-OH-DPAT dentro del rafe dorsal, región de cuerpos celulares 5-HT en ratas intactas.

La sección no pudo alterar la síntesis per se de 5-HT, pero previno el efecto inhibitorio de la síntesis por el 8-OH-DPAT. Hasta ahora, la acción inhibidora de la síntesis por el 8-OH-DPAT es alta-

...mente dependiente del flujo del impulso nervioso intacto en las neuronas 5-HT centrales. Por otra parte, la aplicación local en el rafe dorsal del compuesto a (1 ug), dió por resultado una reducción de la síntesis de 5-HT y de los índices de la liberación medidos en las terminales de 5-HT en el estriado. Estos resultados indican la estimulación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> somatodendríticos y que el 8-OH-DPAT inhibe el flujo del impulso neuronal 5-HT, y de este modo disminuye la síntesis en la terminal 5-HT y la liberación de 5-HT (Hjorth y Magnusson, 1988).

A continuación se presenta un resumen de los aspectos más relevantes en relación a los mecanismos de regulación de la vía serotoninérgica y sus relaciones funcionales con otros sistemas neurotransmisores, con el objeto de seguir un orden lógico y coherente. Una vez conocidos estos datos, pasaremos a relatar todos los aspectos más importantes que existen en torno a la participación colinérgica y serotoninérgica estriatal en relación a procesos de aprendizaje y memoria en diferentes tipos de tareas conductuales.

## INTEGRACION FUNCIONAL.

De acuerdo a los resultados experimentales antes mencionados, podemos concluir describiendo:

### Factores que aumentan la liberación de la serotonina:

- a) La aplicación de apomorfina en la sustancia nigra, aumentó la 5-HT en el ra<sup>f</sup>é dorsal. Este efecto está mediado indirectamente a través de autorreceptores a dopamina en la sustancia nigra y posiblemente por neuronas GABAérgicas en/o cerca del ra<sup>f</sup>é dorsal (Chen y col., 1992).
- b) La activación de receptores nicotínicos y muscarínicos M1 y a GABA en el ra<sup>f</sup>é dorsal, aumentan la 5-HT estriatal. La dopamina en la sustancia nigra y a través de mecanismos que involucren la desinhibición de GABA indirectamente activan neuronas 5-HT en el ra<sup>f</sup>é dorsal y en el estriado (Chen y col., 1992).
- c) La morfina incrementa el metabolismo de 5-HT en el cerebro anterior por la activación de las neuronas 5-HT en el núcleo del ra<sup>f</sup>é dorsal (Spampinato y col., 1985).
- d) Las lesiones con 6-hidroxidopamina en el locus coeruleus produce un incremento de 5-HT en el núcleo del ra<sup>f</sup>é dorsal y disminuye las catecolaminas en el ra<sup>f</sup>é dorsal (Geyer y Lee, 1984).
- e) La hormona tirotrópica (THR) incrementa la liberación de dopamina y serotonina en el núcleo acumbens y en el estriado (Crespi y col., 1986; Crespi, 1986).

*Factores que disminuyen la liberación de la serotonina estriatal:*

- a) *El aumento de la serotonina en el rafé dorsal (Feuerstein y col., 1992; Becquet y col., 1990a)*
- b) *El aumento de la serotonina en el estriado, por un mecanismo de retroalimentación negativo, posiblemente regulado por autorreceptores del subtipo 5-HT1D (Feurstein y col., 1992; Beoquet y col., 1990a).*
- c) *La acción del GABA en el rafé dorsal disminuye la 5-HT tanto en el rafé dorsal como en el estriado. La inhibición GABAérgica de las neuronas serotoninérgicas ascendentes ejercida en el rafé dorsal depende de una actividad neuronal que cursa por la vía habenula-rafé. El GABA ejerce una influencia inhibitoria sobre la transmisión serotoninérgica estriatal vía la estimulación de receptores de GABA localizados en el rafé dorsal (Nishikawa y Scatton, 1985; ver Scatton y col., 1984; Reisine y col., 1984).*
- d) *Via receptores N-Metil-D-aspartato (NMDA), agonista al subtipo de receptor a glutamato y/o el ácido glutámico; incrementan la liberación de dopamina en el estriado e indirectamente actúan sobre la serotonina estriatal, involucrando interneuronas GABA (Becquet y col., 1990b; Huang y Nichol, 1993).*
- e) *La estimulación del núcleo talámico parafascicular por incremento de la liberación de 5-HT en el núcleo del rafé dorsal (Becquet y col., 1989).*

### *Funciones de la serotonina estriatal:*

Es importante tener presente que los datos experimentales al respecto, únicamente permiten inferir a partir de resultados parciales, el posible papel funcional que juega en relación a determinados neurotransmisores, por lo tanto deben considerarse algunas reservas al respecto.

Principalmente y en forma más constante se ha observado que:

- a) Que la serotonina inhibe la liberación de la acetilcolina de las neuronas colinérgicas intraestriatales actuando sobre un receptor presináptico en las terminales colinérgicas (Gillet y col., 1985; Jackson y col., 1988b).
- b) La hiperinervación serotoninérgica del estriado producida por la aplicación de 6-OHDA neonatalmente es acompañada por una pérdida de la influencia inhibitoria de la 5-HT y DA endógena sobre la liberación de la ACh (Jackson y col., 1988a)
- c) Existen reportes que señalan que la serotonina inhibe a las interneuronas colinérgicas, a través del sistema dopaminérgico (Bluth y col., 1985).
- d) Existen también reportes que señalan una posible retroalimentación negativa entre los sistemas colinérgico y serotoninérgico (Jackson y col., 1988b; Siniscalchi y col., 1990).
- e) Menos consistentemente y posiblemente involucrando otro tipo de receptores afines a la serotonina, se ha reportado que la serotonina puede ejercer una función facilitadora en la liberación de la acetilcolina estriatal (Jackson y col., 1988a).

***Papel de la acetilcolina sobre la serotonina en el estriado:***

- a) *Se ha encontrado que la acetilcolina disminuye la liberación de serotonina estriatal por un posible mecanismo de retroalimentación (Siniscalchi y col., 1990).*
- b) *Por otra parte se ha reportado que la acetilcolina inhibe a la serotonina, involucrando interneuronas GABA (Becquet y col., 1988).*

***Papel de los receptores 5-HT2 en el estriado:***

- a) *Los receptores 5-HT2 facilitan o inhiben participando con otros sistemas neurotransmisores a las neuronas colinérgicas estriatales (Bluth y col., 1985; Robinson y col., 1986).*
- b) *El bloqueo de los receptores 5-HT2 reduce el incremento de las concentraciones extracelulares de dopamina producida por el MDMA (Huang y Nichol, 1993; Schmidt y col., 1994).*
- c) *Los receptores 5-HT2 se relacionan a funciones dopaminérgicas, debido a que se han encontrado localizados sobre terminales paminérgicas en el estriado (Muramatsu y col., 1988; Huang y Nichol, 1993).*
- d) *Se han encontrado sitios de unión no serotoninérgicos a |3H| ketanserina, que como se sabe es de alta especificidad para unirse a 5-HT2, su posible función es la regulación de la liberación de monoaminas (Leysen y col., 1988; 1991; Dewar y col., 1990).*
- e) **También**  *existe una estrecha relación entre receptores D2 y*



5-HT<sub>2</sub> en el estriado, teniendo además una estrecha participación con otros sistemas neurotransmisores como el noradrenérgico, GABAérgico, glutamatérgico y opiodes (Muramatsu y col., 1988; Huang y Nichol, 1993; Schmidt y col., 1994; Parentini y col., 1985).

f) Por último es importante reportar que se han encontrado autorreceptores colinérgicos tipo M<sub>3</sub> en el estriado que controlan la liberación de ACh, aunque faltan más evidencias al respecto (Westerink y col., 1990).

Como ya lo hemos comentado en la sección correspondiente a la "estructura de la tesis", en el siguiente capítulo se tratarán los antecedentes relevantes para las hipótesis propuestas en esta investigación. A lo largo de toda la exposición teórica que hemos seguido, se ha visto la importancia que juega el estriado en relación a los diferentes sistemas neurotransmisores que a ese nivel ejercen sus funciones, que hasta este momento son del tipo bioquímico, neurofarmacológico y neurofisiológico. Se ha demostrado a través de numerosos resultados experimentales la estrecha relación que guardan los sistemas colinérgico y serotoninérgico y su directa participación en fenómenos de retroalimentación.

En virtud de que el objetivo central de esta investigación es el estudiar el papel que juega el sistema serotoninérgico en el estriado en procesos de memoria de largo plazo en tareas de prevención pasiva, y dado que hay una gran cantidad de investigaciones de la participación colinérgica en esta estructura estriatal relacionados a memoria y aprendizaje por una parte, y por otra parte hemos mencionado la estrecha relación que guardan los sistemas serotoninérgico y colinérgico en el estriado, es de suma importancia el detallar ampliamente los resultados experimentales de tipo conductual de la participación colinérgica y serotoninérgica en el es-

...triado en diferentes tareas.

Siguiendo un orden lógico, el capítulo IV que se refiere a los antecedentes relevantes para la hipótesis en esta investigación; lo he dividido en dos partes:

- A) Participación colinérgica del estriado en procesos de memoria, en donde se realizó una amplia revisión de los resultados experimentales que existen hasta estas fechas y que de una manera indirecta por el momento, se relaciona con la actividad serotoninérgica que en un futuro investigaremos más ampliamente.
- B) Participación serotoninérgica del estriado en procesos de memoria, de igual forma que para la actividad colinérgica, se efectuó una extensa investigación documental, para señalar los aspectos más importantes de la participación serotoninérgica estriatal en procesos de aprendizaje y memoria.
- C) Por último en esta sección se presentan los resultados experimentales y clínicos más importantes de aquellos trastornos neurodegenerativos que involucran a ambos sistemas, así como también su relación con estructuras como el estriado y otros sistemas neurotransmisores.

## CAPITULO IV

## ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LA HIPOTESIS

## A) Participación colinérgica del estriado en procesos de memoria.

Existe una gran cantidad de experimentos, en los que se documenta la participación de la ACh estriatal en procesos de aprendizaje y memoria. Es conocido desde el punto de vista bioquímico que la actividad colinérgica estriatal se realiza por interneuronas locales que representan casi el uno por ciento de la población celular total (Lynch y col., 1972; McGeer y col., 1975); además, en el estriado existe toda la maquinaria química necesaria para la síntesis y la hidrólisis de la acetilcolina (Potter, 1970; Butcher, S y Butcher, L., 1974; Ladinsky y Consolo, 1974; Lloyd, 1975).

Estos hallazgos y los resultados encontrados en estudios post-mortem en pacientes que cursaron con enfermedades neurodegenerativas tipo Corea de Huntington y en la demencia senil (Sanberg y col., 1978), enfermedad de Alzheimer (Nazarali y Reynolds, 1992), y en aquellos casos en los que la fisostigmina mejoró la memoria de largo plazo en humanos normales y en pacientes con síndrome amnésico (Drachman, 1977) dan un fuerte apoyo a la hipótesis de que estos pa-  
decimientos son debidos, fundamentalmente, a un deterioro del funcio  
sináptico colinérgico del estriado.

Desde el punto de vista experimental, son muchos los estudios que muestran que el estriado representa un eslabón muy importante en los complejos fenómenos del aprendizaje y la memoria. Tanto las

lesiones (permanentes electrolíticas, mecánicas o neuroquímicas) como las reversibles (producidas por la aplicación local en el estriado de anestésicos locales o de KCl) producen incapacidad para aprender (memoria de corto plazo) y para retener (memoria de largo plazo) respuestas condicionadas instrumentales en una gran variedad de especies animales (Kirby y Kimble, 1968; Neill y Grossman, 1970; Mitcham y Thomas, 1972; Glick y Greenstein, 1973; Glick y col., 1974; Winocour, 1974; Polgar y col., 1981).

En los primeros estudios que se efectuaron para comprobar la participación del estriado en procesos de aprendizaje y memoria Borst y col., 1970 efectuaron lesiones bilaterales en el estriado de ratas. Encontraron un déficit importante y reversible sobre la adquisición y retención de una respuesta de alternación condicionada en un laberinto.

Oberg y Divac (1975) lesionaron selectivamente el estriado de ratas y gatos con el fin de analizar su efecto sobre un condicionamiento de alternación con retardo. Las ratas fueron entrenadas en un laberinto en T, en el que se ponía en cada sesión un poco de alimento al final de cada uno de los brazos, alternándose el brazo reforzado en cada sesión, introduciendo un retardo, desde que el sujeto era puesto en la caja meta hasta que le era permitido salir. Los gatos fueron condicionados en una cámara de Skinner que tenía dos comederos sobre los que se encontraba un foco con el que se daba el estímulo condicionado. En esta situación los sujetos fueron entrenados progresivamente hasta alcanzar la etapa de alternación con retardo. En ambas situaciones una vez que los sujetos aprendieron las respuestas, fueron lesionados en tres porciones diferentes del estriado (anteromedial, anterodorsal y posterodorsal). Encontraron un déficit

en la ejecución de la respuesta cuando las lesiones se localizaron en las porciones anteromedial y anterodorsal, siendo más importante este déficit en la primera porción, y ningún efecto cuando la porción lesionada fue la posterolateral. Concluyeron que los efectos de la lesión del estriado dependen del sitio afectado y que el estriado es funcionalmente heterogéneo como ya se ha señalado anteriormente.

En experimentos más recientes realizados por Nakahara y col., 1989, se administró AFB<sub>1</sub>A (ión aziridium de la mostaza de etilcolina) y se encontró un deterioro significativo en las funciones de memoria relacionadas con la ejecución del laberinto en T de una tarea de alternación retardada (ver Nakamura y col., 1992).

Por otra parte, en relación al bloqueo específico de la vía colinérgica en el estriado, Prado-Alcalá y col. (1972) encontraron un estado amnésico que se produjo al aplicar microinyecciones de atropina en el estriado anterior de gatos que habían sido entrenados a presionar una palanca o recorrer un laberinto, para así ser reforzados con leche. Resultados similares se obtuvieron cuando se microinyectó escopolamina en el estriado anterior (pero no cuando se microinyectó en la corteza parietal) de ratas que habían sido entrenadas a presionar una palanca para obtener agua (Prado-Alcalá y col., 1980). En otros experimentos ratones y ratas fueron probados en la adquisición y ejecución de tareas entrenadas en el laberinto acuático de Morris (Lamberty y Gower, 1991) y en el laberinto radial en T de 14 unidades (Spangler y col., 1986), la aplicación de drogas anticolinérgicas alteró la ejecución de dichas tareas.

por otra parte se ha comprobado que la actividad colinérgica del estriado está estrechamente involucrada en la adquisición de conductas mantenidas por la acción de reforzadores positivos. En estos

estudios se determinó el efecto de la alteración de los mecanismos colinérgicos del estriado en un entrenamiento de automoldeamiento en ratas, en donde se hicieron aplicaciones de escopolamina o de solución salina en el estriado anterior o posterior, las microinyecciones se efectuaron 2 minutos después del entrenamiento, y sus efectos se determinaron en sesiones sucesivas. Se encontró que los grupos que fueron tratados con solución salina adquirieron la respuesta instrumental (presionar la palanca), no así los que fueron microinyectados con escopolamina en ambas regiones del estriado (Bermudes-Rattóni y Prado-Alcalá, 1979).

Por otra parte, Prado-Alcalá (1985) reporta que aplicaron acetilcolina en el estriado de gatos, mismos que mostraron una facilitación en la adquisición de una tarea de presionar una palanca.

En otro tipo de experimentos en donde se han utilizado los paradigmas de prevención activa y pasiva se ha encontrado que microinyecciones de colina en el estriado anterior aplicado 6 minutos antes de las sesiones de prueba, producen una mejoría significativa en la ejecución de la prevención activa, y un mayor incremento en la capacidad de respuesta cuando este agente es aplicado en el estriado posterior (Verduzco y col., 1979). Similarmente, cuando se administró colina en el estriado anterior de ratas que habían sido entrenadas en una tarea de prevención pasiva, las ratas mostraron una elevada capacidad de retención (Fernández y col., 1977).

Bajo este mismo criterio, en una tarea de prevención pasiva, las inyecciones intraestriatales de colina revirtieron el efecto amnésico de la aplicación intraestriatal de atropina (Solana-Figueroa y Prado-Alcalá, 1990).

En 1982 Barker y col., en un importante estudio reportaron que la síntesis de acetilcolina se incrementa significativamente en el estriado de las ratas entrenadas en la prevención pasiva.

Utilizando los paradigmas antes señalados; el primer reporte en relación al bloqueo colinérgico del estriado en tareas de prevención activa es el de Neill y Grossman (1970). Ellos encontraron que la aplicación de la escopolamina en el estriado produce una disminución en la capacidad en el aprendizaje de esta tarea. Prado-Alcalá y col., (1984) confirmaron este hallazgo.

En 1973, Haycock y col., en ratas previamente entrenadas a tomar agua fueron sometidas a un choque eléctrico en las patas y probadas 24 horas después, para determinar la retención de la experiencia. Encontraron que si el choque en las patas fue seguido por un estímulo eléctrico único y breve en el estriado o en el hipocampo dorsal, la retención de la experiencia fue deteriorada, además que la aplicación unilateral en el estriado de escopolamina después de la experiencia, también impidió la retención, mientras que no se afectó cuando la sustancia se aplicó en forma unilateral en el hipocampo.

También se ha encontrado que el efecto amnésico al aplicar atropina en el estriado depende del tiempo y la dosis administrada, a mayor dosis de la droga administrada mayor es el deterioro que se produce (Fernández y col., 1977; Prado-Alcalá y col., 1981; Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Díaz del Guante y col., 1991).

Existe pues, un gran número de resultados experimentales que sugieren que la actividad colinérgica del estriado juega un papel importante en procesos de aprendizaje y memoria. En esta estructura se encuentran altas concentraciones de colina y acetilcolina, así como de las enzimas que intervienen en su metabolismo. Además, la

estimulación sensorial induce la liberación de ACh en el estriado, y pueden observarse efectos similares ante su estimulación eléctrica; la aplicación iontoforética de ACh incrementa la actividad de algunas neuronas de esta estructura, mientras que la electroforesis de drogas anticolinérgicas produce el efecto opuesto.

Desde el punto de vista anatómico, este sistema colinérgico se encuentra totalmente contenido dentro del estriado y está representado por interneuronas, mismas que interactúan muy estrechamente con otros neurotransmisores como ya ha sido señalado.

Desde el punto de vista funcional, la ACh en el estriado se encuentra regulada principalmente por la serotonina, es por ello que a continuación se tratará todo lo concerniente a la serotonina estriatal y su participación en los procesos de aprendizaje y memoria.

#### B) Participación serotoninérgica del estriado en procesos de memoria

Ögren, en 1985 efectúa un estudio detallado del papel de la neurotransmisión de la serotonina en aprendizaje de evitación en ratas machos, usando aproximaciones neuroquímicas, farmacológicas y conductuales. Se examinó el efecto agudo y a largo plazo de la p-cloroamfetamina (PCA) en la adquisición de tareas de prevención activa de una y dos vías (PA) y la retención en la prevención pasiva (PP), y sobre la concentración de monoaminas.

Los efectos de la PCA fueron comparados con el inhibidor de la síntesis de 5-HT, la p-clorofenilalanina (PCPA). Para caracterizar los efectos de la PCA fueron utilizadas las siguientes neurotoxinas: la 5,6- y la 5,7-dihidroxitriptamina (5,6- y 5,7-DHT) y la N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzylamina (DSP4). La concentración de monoa-



minas biógenas y sus metabolitos en discretas regiones cerebrales fueron determinados por cromatografía líquida a alta presión con o sin detección electroquímica. Los efectos sobre los receptores a 5-HT en vivo y en vitro fueron medidos en estudios de uniones a ligandos (usando los radioligandos  $^3\text{H}$ 5-HT y  $^3\text{H}$ ketanserina con sus respectivas técnicas conductuales.

La administración del liberador de la 5-HT, la PCA antes del entrenamiento produjo un daño dosis y tiempo dependiente en la adquisición en la PA y en la retención en la PP. Los déficits en el aprendizaje de evitación producidos por la PCA, son causados por la liberación de la 5-HT que estimula receptores post-sinápticos de 5-HT. Por ejemplo, los déficits en la evitación fueron bloqueados a través del tratamiento previo con los inhibidores de la recaptura de 5-HT, el alaproclate y zimeldine; los cuales inhiben la liberación de 5-HT inducida por PCA. Los déficits en la evitación no pudieron ser relacionados a cambios (directos o indirectos) en la transmisión de noradrenalina y dopamina.

Los resultados de las lesiones experimentales en combinación con análisis bioquímicos, aportan evidencias en el sentido de que los déficits en la evitación causados por la PCA involucran terminales 5-HT del cerebro anterior, mientras que las proyecciones descendentes 5-HT, parecen jugar un papel menor. Los déficits en la adquisición de la PA inducidos por la PCA parecen ser mediados vía la estimulación de receptores 5-HT<sub>2</sub>, mientras que la retención en la PP es mediada probablemente por la vía receptores 5-HT<sub>1</sub>. La administración pre-entrenamiento de PCA produjo una pérdida de la memoria de retención tiempo-dependiente en los animales que habían adquirido la respuesta. Estos descubrimientos indican que la serotonina juega un papel

importante en el proceso de aprendizaje asociativo, información que es procesada en el cerebro de la rata después de la adquisición.

En esta misma línea se estudiaron los efectos de la liberación de la serotonina por la PCA (2.5 mg/kg) sobre la adquisición, retención y recuperación de la memoria en pruebas de evitación, en ratas utilizando tareas de prevención activa y pasiva. La PCA fue inyectada i.p. antes del entrenamiento, seguida a la adquisición y previa a la prueba de la retención 24 horas después del entrenamiento. La administración pre-entrenamiento de PCA, dañó marcadamente la adquisición en la prevención activa. Las ratas tratadas con PCA antes del entrenamiento mostraron una deficiencia dosis-dependiente en la retención en tareas de prevención activa y pasiva, lo cual no pudo ser explicado en términos de cambios en la actividad locomotora o alteraciones en el comportamiento en el transcurso de la prueba o en la retención por dependencia del estado (Ögren, 1986a).

La administración post-entrenamiento de PCA fracasó en afectar la retención en la PA pero no en la PP. La administración pre-entrenamiento i.p. de PCA produce una pérdida progresiva en la ejecución tanto en la PA como la PP en los intervalos de retención. Los resultados antes señalados sugieren que la serotonina tiene efectos duales en los procesos fundamentales en el aprendizaje y la memoria, involucrando procesos de aprendizaje asociativos y no asociativos en la rata. La pérdida en la retención de la memoria tiempo-dependiente, seguida a la liberación de la serotonina, indica que la 5-HT juega un papel en el procesamiento de la información en el cerebro (Ögren, 1986a).

En otros estudios se ha visto que la administración sistémica de la PCA produce degeneración de los axones serotoninérgicos; sin embargo, datos recientes indicaron que esta droga por sí misma no es

neurotóxica cuando se aplica directamente a los axones de 5-HT. Se estudió si los efectos tóxicos de PCA en el cerebro dependen de la liberación endógena de 5-HT y también para determinar si el almacenamiento de 5-HT se encuentra involucrado. Los efectos a largo plazo de la PCA sobre los niveles cerebrales de 5-HT y sobre los axones centrales de 5-HT, fueron determinados en ratas en las que inicialmente fueron agotadas de 5-HT por la administración de p-clorofenilalanina y reserpina.

Los resultados muestran que el agotamiento transitorio de 5-HT dá una protección substancial contra la degeneración subsecuente inducida por la PCA en los axones terminales; la neurotoxicidad inducida por la PCA hasta el momento parece depender de la presencia del almacenamiento endógeno de 5-HT. En síntesis, el efecto protector del agotamiento de 5-HT se encuentra solamente después de regímenes de tratamientos previos que disminuyeron tanto periféricamente como centralmente el almacenamiento de 5-HT. Estos resultados se interpretan como evidencia en el sentido de que la liberación de 5-HT en los sitios de almacenamiento periférico pueden ser necesarios para la expresión de la toxicidad inducida por la PCA. Basados en lo anterior, se propone que la neurotoxicidad central no es inducida por una acción directa solamente de la PCA, sino también puede requerir o estar aumentada por un metabolito tóxico de 5-HT (Berger y col., 1992).

En otras investigaciones, se estudiaron los déficits en la retención inducidos por la administración aguda de PCA seguida al condicionamiento aversivo en la rata. El procedimiento consistió en la aplicación de 4 choques eléctricos en las patas, con una intensidad de 1.0 mA, en el compartimiento de castigo. Cuando la PCA fue inyectada antes de la prueba de retención, 24 horas después, bloqueó

completamente la postura inmóvil que la rata asumió cuando fue inyectada con salina. El déficit en la retención estuvo asociado selectivamente a la liberación de la serotonina, puesto que la administración de los inhibidores de la recaptura de 5-HT, el zimeldine y el citalopran aplicados 60 minutos antes de la PCA, antagonizaron este efecto. La especificidad de la 5-HT en el déficit quedó establecida fuertemente por el descubrimiento en que las ratas agotadas de 5-HT (PCA, 2 X 10 mg/kg, y fenfluramina, 2 X 25 mg/kg) pero no las ratas agotadas de NA (DSP4, 1 X 50 mg/kg), o ratas tratadas con zimeldine (2 X 20 mg/kg) 60 minutos antes de la PCA (2 X 10 mg/kg) mostraron un bloqueo casi completo del deterioro en la retención (Archer y col., 1984).

En otros experimentos se estudió el papel que juega la dopamina en el agotamiento de la serotonina a largo plazo por la PCA en el cerebro de la rata. También se investigaron compuestos relacionados y se compararon con los efectos del beta, beta-difluoro-p-cloroanfetamina (beta, beta-difluoro-PCA) y 4-metil-alfa-etil-meta-tiramina (H75/12), que causan sólo agotamiento de serotonina a corto plazo a diferencia de la PCA. La aplicación de una sólo dosis de beta, beta-difluoro-PCA, no tuvo efecto a largo plazo sobre la serotonina en todo el cerebro de la rata, de igual forma que con la aplicación de un tratamiento previo con proadifen (que permite una mayor permanencia de la beta, beta-difluoro-PCA en el cerebro). La posibilidad de que el proadifen pueda antagonizar el agotamiento de la serotonina quedó excluida. El proadifen no pudo evitar el agotamiento de la serotonina cerebral a largo plazo por la PCA. El agotamiento de la serotonina cerebral a largo plazo se encontró después de repetidas inyecciones de beta, beta-difluoro-PCA (cinco inyecciones una cada cua-

...tro horas) y fue prevenido por un tratamiento previo con fluoxetine.

El beta,beta-difluoro-PCA administrado después del inhibidor de la monoaminoxidasa (el pargiline), o después de la carbidopa/L-dopa, también produjo agotamiento de la serotonina a largo plazo, aunque el H75/12 no lo hizo. A corto plazo, después de una sola dosis, se produjo el mismo agotamiento inicial de la serotonina, la PCA produjo un gran incremento de la dopamina y una disminución en el metabolito ácido 3,4-dihidroxifenilacético en todo el cerebro; de ese modo se incrementó la relación dopamina/3,4-dihidroxifenilacético. Las otras dos drogas causaron pequeños efectos. La dopamina extracelular se incrementó marcadamente por la PCA, en menor cantidad por la beta,beta-difluoro-PCA y no hubo efecto con H75/12. Estos resultados sugieren una asociación entre la liberación de la dopamina y el agotamiento de la serotonina a largo plazo y se suman para evidenciar que la liberación de dopamina por PCA puede ser esencial para su acción neurotóxica sobre neuronas serotoninérgicas cerebrales (Henderson y col., 1993).

Por otra parte, se ha estudiado la relación que guarda el agotamiento de la serotonina con la lesión del núcleo magnocelular en tareas de discriminación espacial utilizando el laberinto radial en T de catorce unidades. En estos estudios se determinaron los efectos de lesiones en neuronas colinérgicas originadas en el núcleo basal magnocelular (NBM) únicas o en combinación con el agotamiento de la serotonina central sobre el aprendizaje y la memoria en ratas entrenadas en tareas reforzadas positivamente con pruebas de discriminación espacial en el laberinto radial. La lesión de las neuronas colinérgicas dentro del NBM se obtuvo por la infusión bilateral de ácido iboténico. El agotamiento de la serotonina se consiguió por la

administración sistémica de PCA. Los resultados muestran que el agotamiento de la serotonina inducida por la PCA mejoró el aprendizaje. Este efecto fue completamente prevenido por lesiones en el NBM, a pesar del hecho de que lesiones únicas en el NBM no afectaron la ejecución de la tarea en las ratas. Estos datos apoyan el punto de vista de la interacción entre los sistema colinérgico y serotoninérgico (Normile y col., 1990),

En la misma línea de investigación, se estudiaron los efectos del agotamiento serotoninérgico sobre la ejecución en tareas de memoria no espacial en ratas a las que se les lesionó el NBM con inyecciones de ácido iboténico. La serotonina fue agotada con inyecciones sistémicas de PCA. Después de cuatro semanas de prueba, las ratas a las que se les aplicó la PCA no difirieron de las ratas control (CON), mientras que las ratas con lesiones en el NBM y ratas con la combinación de tratamientos NBM + PCA, las ejecuciones fueron significativamente bajas en relación a las CON. Después de la prolongada prueba, la ejecución se mejoró en ratas con NBM, pero no en las ratas NBM + PCA, indicando que la pérdida simultánea de la neurotransmisión colinérgica y serotoninérgica produce un déficit significativo en el comportamiento más duradero que aquellos casos en que la pérdida fue solamente de la neurotransmisión colinérgica (Markowska y Wenk, 1991).

Por otra parte se investigó la interacción de los sistemas colinérgico y serotoninérgico en tareas de memoria de trabajo. Las ratas fueron inyectadas i.p. con escopolamina y/o metisergide. El sistema serotoninérgico fue agotado por PCA. La escopolamina, pero no la PCA, dañó la ejecución adecuada de la respuesta. Los efectos de metisergide y escopolamina juntos no fueron diferentes que los de

escopolamina sólo. La escopolamina tuvo un efecto significativamente menor en la ejecución adecuada de la respuesta en las ratas tratadas con PCA que en las ratas no tratadas con la PCA (Sakurai y Wenk, 1990).

En otros experimentos, se valoró el efecto de antagonistas al receptor serotoninérgico y su combinación con la escopolamina sobre la memoria. Utilizando el paradigma de prevención pasiva, se encontró que el bloqueo de receptores a serotonina con metisergide, metergolina y ritanserina a dosis de 5 mg/kg, administradas i.p. 30 minutos antes de la sesión de entrenamiento, así como la administración de la escopolamina a una dosis de 2 mg/kg 90 minutos antes del entrenamiento, dañaron la adquisición y las huellas de la retención de la memoria.

Un deterioro en la memoria también se manifestó por la mala habituación al tratamiento de metergolina y escopolamina en aquellas ratas situadas en un medio ambiente no conocido. El déficit en la memoria fue incrementado por la combinación de metergolina o ritanserina con escopolamina. La múltiple administración antes del entrenamiento de la droga adafenoxate previno completamente el efecto amnésico de la combinación metergolina más escopolamina (Petkov y col., 1991).

Por otra parte, se investigó un nuevo inhibidor de la recaptura de serotonina, el (-)trans 4-(4-fluorofenil)-3-(4-metoxifenoxi-metil) hidroclorehidro de piperidine (FG-7080) en relación a sus efectos sobre la mala ejecución producida por la escopolamina en tareas en un laberinto radial. El FG-7080 (3 mg/kg v.o.) revirtió las malas ejecuciones producidas por la escopolamina. El FG-7080 (1 mg/kg, v.o.) administrado antes del entrenamiento, disminuyó los déficits en la prevención pasiva. También se ha visto que este compuesto muestra

efectos de mejora en tareas de memoria apetitiva y aversiva. Se concluye que el FG-7080 puede aminorar los deterioros cognitivos producidos por la disfunción colinérgica (Miura y col., 1993).

Por otra parte, se estudió el efecto del oxiracetam sobre respuestas condicionadas de prevención pasiva, valorando los niveles de acetilcolina después de producir las lesiones selectivas de las vías monoaminérgicas. Las lesiones fueron seguidas por un marcado decremento en la serotonina cortical (-88%), noradrenalina (-54%) y dopamina estriatal (-57%), mientras que la ejecución de la respuesta condicionada de prevención pasiva o los niveles de acetilcolina cerebral no fueron afectados. La administración de escopolamina (0.63 mg/kg, s.c.) en las ratas lesionadas ejerció el efecto amnésico esperado; asociado con un decremento en los niveles de ACh en hipocampo, corteza y estriado.

En ratas con degeneración de la vía dopaminérgica y noradrenérgica, pero no serotoninérgica, el oxiracetam (50 y 100 mg/kg, s.c.) fue incapaz para prevenir tanto la amnesia como la disminución de los niveles de ACh cerebral producidos por la escopolamina. El efecto del oxiracetam fue prevenido por haloperidol (0.2 mg/kg, s.c.). Estos experimentos apoyan la hipótesis que la interacción entre los sistemas neurotransmisores monoaminérgico y colinérgico puede estar involucrada en la acción de drogas nootrópicas sobre las funciones cognitivas (Giovannini y col., 1991).

Otras evidencias recientes también sugieren que la serotonina juega un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria en animales. En estos estudios se examinó el efecto del antagonista al receptor 5-HT<sub>3</sub>, el granisetron (BRL 43694), sobre la adquisición, retención y recuperación en ratones en una tarea de prevención pasiva. El granisetron (1 y 10 ug/kg) administrado 30 minutos antes



del entrenamiento, incrementó las latencias de retención cuando la prueba se realizó 24 horas después de la sesión de entrenamiento. Los procesos en la adquisición no fueron afectados a una dosis de 100 ug/kg. El granisetron (10 y 100 ug/kg) produce un incremento significativo en las latencias de retención, cuando es administrado inmediatamente después o las 23,5 horas después del choque eléctrico. Sin embargo, una dosis de 1 ug/kg de ganisetron no tuvo efecto. Estos resultados confirman el importante papel de la 5-HT en los procesos de aprendizaje y memoria. También sugieren que el mejoramiento de la memoria puede ser posible con tratamientos no colinérgicos o la combinación de ambos (Chugh y col., 1991b).

En otras investigaciones se ha valorado los efectos combinados de la inhibición de la acetilcolinesterasa y el bloqueo de receptores serotoninérgicos en casos de daño a la memoria asociados con la edad en las ratas. Como ya ha sido reportado, la administración post-entrenamiento de antagonistas a receptores serotoninérgicos atenúan los déficits en la memoria en tareas de prevención pasiva que normalmente exhiben las ratas viejas. Se estudió si una dosis subefectiva de ketanserina (bloqueador de receptores 5-HT<sub>2</sub>), puede incrementar el efecto facilitador producido por un inhibidor de la acetilcolinesterasa, la fisostigmina, sobre la memoria en ratas viejas, utilizando la misma tarea. Las drogas fueron inyectadas intraperitonealmente sólo o combinadas, inmediatamente después del entrenamiento. La prueba de la retención ocurrió a las 24 horas. Un mejoramiento dosis-dependiente resultó de las dos condiciones de tratamiento (fisostigmina 0.01-10 ug/kg, ketanserina 1.0 mg/kg + fisostigmina 0.001-0.01 ug/kg). La facilitación de la memoria producida por la combinación de los tratamientos fue observada a una dosis muy por debajo a aquella requerida para producir un efecto similar cuando cada droga fue

sola. Los resultados apoyan evidencias previas que indican que existe entre los sistemas neurotransmisores colinérgico y serotoninérgico una interacción que participa en procesos de aprendizaje y memoria, además de tener importantes implicaciones en el tratamiento de los daños en la memoria relacionados con la edad (Normile y Altman, 1988; 1992; Decker y McGaugh, 1991).

En otros experimentos, se investigó el efecto del antagonista al receptor 5-HT<sub>3</sub>, el ICS 205-930, en la recuperación de un hábito aver-sivo previamente aprendido en el ratón. También se estudió el efecto de ICS 205-930 sobre la amnesia inducida por la escopolamina (3 mg/kg). La ICS 205-930 (1, 10 y 10 ug/kg) produjo un incremento dosis-dependiente en la retención. El daño en la memoria inducido por la escopolamina fue atenuado significativamente por ICS 205-930 (10 ug/kg. Estos resultados sugieren que los déficits en la memoria pueden ser susceptibles a mejorar con tratamientos no colinérgicos (Chug y col., 1991a).

En otros experimentos, se estudió el papel que juega el sistema serotoninérgico en la amnesia inducida por ciclohexamida (CXM) en pruebas de prevención pasiva en ratones. La CXM (30 mg/kg, s.c.) administrada inmediatamente después del entrenamiento produjo un daño en la memoria. El antagonista no selectivo a 5-HT, metisergide, y el antagonista selectivo a 5-HT<sub>2</sub>, la ritanserina, atenuaron significativamente el daño en la memoria producido por la CXM. El antagonista a 5-HT<sub>1</sub> (+/-)-pindolol no tuvo efecto en la amnesia inducida por la CXM. El efecto antiamnésico de la ritanserina sobre la amnesia provocada por CXM fue antagonizada por 5-HT (ICV), pero no por el agonista no selectivo a 5-HT, el 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina, y el agonista selectivo a 5-HT<sub>1A</sub>, el 8-OH-DPAT, a iguales dosis que no producen alteraciones en la memoria. La escopolamina antagonizó

el efecto antiamnésico de la metisergida y la ritanserina sobre la amnesia inducida por la CXM.

Estos resultados sugieren que los receptores 5-HT<sub>2</sub> y el sistema neural colinérgico pueden jugar un importante papel en el establecimiento de la memoria (Nabeshima y col., 1989a). Por otra parte se investigó la interacción serotoninérgica y colinérgica en relación a la ejecución de una tarea de memoria espacial. El bloqueo de la transmisión colinérgica con una alta dosis de atropina dañó la ejecución de una tarea en el laberinto acuático de Morris. Una reducción parcial de la transmisión colinérgica utilizando una baja dosis de atropina no tuvo efecto en la ejecución. La reducción de la síntesis de serotonina utilizando PCPA no tuvo efecto sobre la ejecución de tal tarea. Sin embargo, una combinación de tratamientos con una baja dosis de atropina y PCPA dañó severamente la ejecución de las ratas en el laberinto acuático. Las ratas fueron dañadas tanto en la adquisición de la tarea espacial inicial como en la readquisición de una nueva posición espacial (memoria de trabajo). Estos resultados sugieren una interacción entre la transmisión colinérgica y serotoninérgica en la adquisición y retención de la información espacial. Además existe la propuesta de que los déficits observados con la edad o en la enfermedad de Alzheimer, puede resultar de la combinación en la reducción de la transmisión colinérgica y serotoninérgica (Richter-Levin y Segal, 1989b).

En experimentos adicionales se estudió la interacción funcional entre los sistemas colinérgico y serotoninérgico en la recuperación de la memoria. En el experimento 1 los efectos de la administración de diferentes dosis del agonista serotoninérgico alaproclate antes de la prueba y del agonista selectivo muscarínico oxotremorina sólo

y en combinación, fueron evaluados en una tarea de prevención pasiva de un sólo ensayo. Un claro mejoramiento en la ejecución dependiente de la dosis, fue demostrado como resultado de las tres condiciones de tratamiento. Estos resultados no pudieron ser explicados en términos de efectos no específicos de las drogas sobre la conducta general. En suma, la facilitación de la recuperación de la ejecución producida por la combinación de tratamientos de alaproclate y oxotremorina se observó en niveles de dosis muy por debajo a aquellos observados seguidos a la administración de cada uno de ellos por separado.

En el experimento 2, se buscó bloquear el mejoramiento de la retención que resultó de las diferentes condiciones de tratamiento (alaproclate, oxotremorina o la combinación de alaproclate y oxotremorina) asociado al tratamiento previo de escopolamina (antagonista muscarínico colinérgico) o quipazina (un agonista serotoninérgico) en el ratón. Los resultados indican que (a) la quipazina bloqueó completamente el mejoramiento de la recuperación resultante del alaproclate, pero no aquel que fue producido por la oxotremorina sola o por la oxotremorina en combinación con el alaproclate; (b) la escopolamina bloqueó el mejoramiento de la recuperación que resultó de la oxotremorina sola, así como de aquel de alaproclate más oxotremorina pero fracasó para bloquear el mejoramiento de la memoria que resultó del alaproclate. Los presentes resultados dan un fuerte apoyo a la tesis de que la acetilcolina y la serotonina juegan un papel importante en la recuperación de la memoria, de igual modo que su interacción funcional en el sistema nervioso media a la conducta (Altman y col., 1987).

En otros experimentos, se estudiaron los efectos del alaproclate y el zimeldine sobre la recuperación de la memoria en ratones machos en tareas de prevención pasiva en un sólo ensayo. Las drogas fueron administradas i.p. previas a la prueba de retención 24 horas después del entrenamiento. Se encontró que ambas drogas facilitan la recuperación de la memoria significativamente en una forma tanto dosis como tiempo dependientes, que no fue explicada en términos de efectos no específicos de las drogas (enfermedad, carencia de motilidad, etc) en el curso de la prueba. Los efectos temporales del alaproclate y zimeldine sobre la memoria siguieron estrechamente al curso de su concentración de la droga dentro de la corriente sanguínea. La facilitación de la recuperación inducida por el alaproclate y el zimeldine fue bloqueada por el agonista al receptor serotoninérgico quipazine, pero no fue bloqueado por el antagonista ciproheptadine.

El tratamiento previo con quipazine a un grupo de animales entrenados con un choque eléctrico que normalmente muestra altos niveles de supresión, no fue suficiente para producir daño en la memoria, lo que sugiere que el quipazine fue probablemente antagonizando los efectos facilitadores del alaproclate y el zimeldine en forma directa, en lugar de anular la facilitación a través de una acción indirecta sobre la recuperación general. Estos resultados dan un apoyo adicional a la tesis de que la serotonina juega un papel significativo en la memoria (Altman y col., 1984).

En otros experimentos, Altman y Normile (1986) examinaron los efectos de la administración pre-prueba de una variedad de antagonistas a los receptores serotoninérgicos en la recuperación de un hábito aversivo previamente aprendido en el ratón. Los antagonistas a los receptores 5-HT (píperone, ketanserina, mianserina, metisergide y

metergolina) produjeron un incremento en las latencias, en forma dependiente de las dosis, para completar 5 s de bebidas 48 horas después del entrenamiento. Esta supresión en las bebidas no se atribuyó a efectos no específicos de las drogas sobre el comportamiento (enfermedad, reducción de la actividad o sed).

Por otra parte, se realizaron experimentos para examinar los efectos de la administración aguda de tres diferentes antagonistas al receptor serotoninérgico (ketanserina, pirenperone y mianserina) en tareas de prevención pasiva de un sólo ensayo en el ratón. La administración de cada uno de los antagonistas 30 minutos antes del entrenamiento produjo un daño dosis-dependiente en la retención. En contraste, la administración de cada uno de estos antagonistas inmediatamente después del entrenamiento produce un mejoramiento dosis-dependiente en la retención. Los efectos tiempo-dependientes de la administración de los antagonistas pre o post entrenamiento fueron evaluados usando pirenperone. Los resultados aportan evidencias adicionales de la importancia funcional de los diferentes papeles de la serotonina en los procesos de aprendizaje y memoria en el sistema nervioso (Altman y Normile, 1987).

En otros experimentos, se encontró que el (3-alfa-trofanil)1H-benzimidazolone-3-carboxamide clorhidro (DAU 6215), un nuevo antagonista al receptor 5-HT<sub>3</sub>, antagonizó selectivamente el déficit inducido por la escopolamina en una tarea de prevención pasiva, pero no la hiperomotilidad inducida por la escopolamina en las ratas. El estudio consistió en la aplicación de la escopolamina (0.75 mg/kg, i.p.) misma que deterioró la adquisición en la prueba de retención en una tarea de prevención pasiva en un sólo ensayo. El tratamiento previo con DAU 6215 (1, 10, 30 y 100 ug/kg, i.p.) antagonizó el déficit inducido

por la escopolamina, dando una curva dosis-respuesta. La escopolamina a la dosis señalada produjo un incremento significativo en la actividad locomotora, misma que no fue afectada por el tratamiento previo con DAU 6215 (10 y 30 ug/kg, i.p.). Estos resultados apoyan la sugerencia de que los antagonistas a los receptores 5-HT<sub>3</sub> pueden evitar las alteraciones en la memoria producidos por una reducción en la función colinérgica central en la rata. La ineficacia mostrada por el DAU 6215 sobre la hiperactividad inducida por la escopolamina parece excluir la posibilidad de una interferencia farmacocinética entre el DAU 6215 y la escopolamina (Brambilla y col., 1993).

En la misma línea se valoró el efecto de diferentes dosis (1, 10, 30 y 100 ug/kg, i.p.) de DAU 6215 sobre los déficits en la ejecución y la memoria producidos por la escopolamina (0.2 mg/kg, s.c.) evaluados en la prueba del laberinto acuático de Morris. No se observó efecto sobre la ejecución en las ratas tratadas solamente con DAU 6215. Las dosis de 10 y 30 ug/kg de DAU 6215 atenuaron los déficits en el comportamiento provocados por la escopolamina (Pitsikas y col., 1994).

Por otra parte y en experimentos recientes, se ha encontrado que la administración oral del insecticida endosulfan (2 mg/kg por día) por 90 días en ratas macho inmaduras, dió por resultado una inhibición en la respuesta de escape al choque eléctrico (incondicionado) y a la evitación a un zumbido (respuesta condicionada) en una prueba aversiva. La respuesta al escape, pero no la respuesta de evitación condicionada, fue recuperada significativamente por el agotador de la serotonina PCPA (100 mg/kg diariamente por tres días). El endosulfan incrementó las concentraciones de 5-HT en el cerebro y cerebro medio. El contenido de proteínas y la actividad de la acetilcolinesterasa no se afectaron en el cerebro. La actividad motora

espontánea en estos animales fue estimulada. Su coordinación muscular probada en el aparato "rota-rod" no se alteró. Estos descubrimientos fueron interpretados en el sentido de que existió un déficit en los procesos asociativos y no un daño motor, como el responsable para las acciones inhibitorias del endosulfan en las respuestas de evitación y escape. A partir de estos resultados podemos concluir la importancia de la vía serotoninérgica sobre procesos de aprendizaje y memoria (Paul y col., 1994).

En otro tipo de experimentos se estudiaron los efectos del 20(S)-ginsenoside-Rg2 (GRg2, CAS 52286-74-5) y el cyproheptadine (CYP, CAS 129-03-3) sobre la adquisición, retención y recuperación de la memoria en ratas macho Wistar en tareas de prevención activa de dos vías. El aprendizaje y la memoria fueron estimados por el grado de evitación (%) y/o por las latencias (s). La administración aguda de CYP (1.0 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes del entrenamiento produce un daño significativo en la adquisición y en la memoria. La administración de CYP inmediatamente después del entrenamiento y 30 minutos antes de la prueba produce un daño en la retención y en la recuperación de la memoria, respectivamente. La administración repetida de GRg2 (20 mg/kg, i.p.) mejoró significativamente el déficit en el reconocimiento, inducido por CYP en la retención y recuperación de la memoria. Estos datos en su conjunto apoyan la tesis de que la serotonina juega un papel modulador positivo en la adquisición, retención y recuperación de la memoria en la prevención activa de dos vías en las ratas (Ma y Yu, 1993).

Por otra parte y estudiando el papel que juegan los receptores 5-HT1A, se han realizado diferentes tipos de investigaciones en donde encontramos lo siguiente: se ha visto que el agonista al re-



...ceptor 5-HT1A, el tandospirone, induce una amnesia anterógrada a través de mecanismos post-sinápticos en una tarea de prevención pasiva de un sólo ensayo en ratones. El tandospirone alteró la ejecución en una forma dosis-dependiente cuando se administró antes del entrenamiento pero no cuando se aplicó después del entrenamiento. El déficit en la ejecución fue mejorado con el tratamiento con d-anfetamina antes de la prueba de retención. El daño en la memoria por el tandospirone fue imitado por el agonista al receptor 5-HT1A, el 8-OH-DPAT y bloqueado por el antagonista al receptor 5-HT1A, el 8-(2-(4-(2-metoxifenil)-1-piperazinyl)etil)-8-azaspirol-(4)-decano-7,9-dione) (BMY 7378). El BMY 7378 aplicado sólo fue inefectivo. El tratamiento con el inhibidor de la síntesis de 5-HT, la PCPA, produjo una aparente mejora, más bien que la alteración en el comportamiento de evitación. Sin embargo, el efecto amnésico anterogrado del tandospirone y por el 8-OH-DPAT no fueron afectados por la PCPA, y la falta de interacción entre PCPA y el agonista a 5-HT1A revelado en el análisis estadístico, indicó que el efecto de la PCPA no estuvo mediado por receptores 5-HT1A. Se concluye que el agonista al receptor 5-HT1A y agonistas parciales producen una amnesia anterograda reversible que es mediada por receptores post-sinápticos 5-HT1A (Mendelson y col., 1993)..

También se ha visto que el 8-OH-DPAT daña la ejecución en tareas de prevención pasiva. El efecto de diferentes dosis subcutáneas (30, 100 y 300 ug/kg) en ratas resultó en los siguiente: cuando fue administrado 30 minutos antes del entrenamiento y 30 minutos antes de la prueba de retención, el 8-OH-DPAT reduce significativamente las latencias de retención a todas las dosis señaladas. Resultados similares fueron obtenidos cuando el 8-OH-DPAT fue administrado an-

...tes del entrenamiento o antes de la prueba de retención. Cuando se administró 5 minutos después del entrenamiento a dosis de 100 y 300 ug/kg el 8-OH-DPAT disminuye significativamente las latencias de retención, mientras que 30 ug/kg produce una tendencia no significativa a la disminución. Una dosis de 300 ug/kg de 8-OH-DPAT incrementó significativamente el umbral para diferentes respuestas (lanzarse, brincar y vocalizar) provocadas por el choque eléctrico, cuando se aplicaron 30 y 100 ug/kg no hubo efecto. Cuando se administró la 8-OH-DPAT 30 minutos antes de la prueba de retención, las ratas fueron capaces de elegir entre el compartimiento de castigo y el de seguridad, el 8-OH-DPAT a 100 y 300 ug/kg facilitó la re-entrada en uno u otro compartimiento, pero del mismo modo que los animales control, la mayoría de los animales tratados con 8-OH-DPAT prefirieron el compartimiento de seguridad. Si bien los efectos del 8-OH-DPAT sobre la percepción del dolor, actividad general o conducta emocional puede interferir con la ejecución de las ratas en tareas de prevención pasiva, los resultados sugieren que 100 y 300 ug/kg de 8-OH-DPAT interfieren con mecanismos relacionados con la adquisición y consolidación de la memoria (Carli y col., 1992).

Por otra parte, se observó que la administración de 2 y 5 ug/kg de 8-OH-DPAT dentro de la región CA1 del hipocampo dorsal 10 minutos antes del entrenamiento en una tarea de prevención pasiva, disminuye significativamente las latencias de retención 24 horas después del entrenamiento. El efecto de 5 ug/kg de 8-OH-DPAT sobre las latencias de retención fueron antagonizados por 1 ug/ul de spiroxatrine, un antagonista al receptor 5-HT1A aplicado dentro del hipocampo dorsal 5 minutos antes de la aplicación del 8-OH-DPAT. La administración de 5 ug/kg de 8-OH-DPAT 5 minutos después del entrenamiento no tuvo

efecto sobre las latencias de retención 24 horas después del entrenamiento. Esta dosis no tuvo efecto antidepresivo en la prueba de nado forzado. Por otra parte con la misma dosis en el hipocampo dorsal produjo un efecto ansiolítico evaluado en el déficit de estrés inducido en su actividad locomotora en campo abierto. Estos resultados sugieren que la estimulación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en el hipocampo dorsal dañó la ejecución en las ratas en tareas de prevención pasiva por interferir con los procesos de la memoria, o por atenuar el impacto emocional del choque a través de una acción ansiolítica (Carli y col., 1993).

Por otra parte se ha observado que los agonistas a 5-HT<sub>1A</sub>, el tandospirone o buspirone en pruebas de condicionamiento aversivo, actúan deteriorando la adquisición en tareas, en donde también se utilizó el diazepam. Se observó que el tandospirone y el buspirone alteran el condicionamiento aversivo cuando son administrados antes de la sesión de condicionamiento, pero no antes de la prueba de la tarea. El diazepam alteró el condicionamiento en ambos tiempos. El efecto del tandospirone sobre el condicionamiento aversivo pudo ser revertido con la administración de d-anfetamina previa a la prueba de retención, lo cual sugiere que la información fue almacenada pero inaccesible para la señal de la recuperación normal. El tandospirone y buspirone también retardan la extinción, una clara indicación de que la alteración producida por estas drogas no está relacionada a su acción ansiolítica (Quartermain y col., 1993).

En otros experimentos, Meneses y Hong (1994a) utilizando una prueba de aprendizaje asociativo llamada automoldeamiento, estudiaron el efecto agudo de 8-OH-DPAT, administrado en ratas antes o después del entrenamiento. Los resultados muestran que el 8-OH-DPAT mejoró la consolidación de la respuesta condicionada (RC) cuando fue

inyectada post-entrenamiento, pero daño cuando se administró previa al entrenamiento. Ambos efectos fueron tiempo-dependientes. Cuando el compuesto fue administrado pre o post-entrenamiento en animales libres de alimentos o prealimentados, ellos no aprendieron la RC. Cuando fue administrado en animales entrenados privados de alimentos, el compuesto fue también inefectivo. Sin embargo, en animales entrenados con un horario libre de alimentos, la administración pre o post-entrenamiento de 8-OH-DPAT mejoró la recuperación en forma dependiente de la dosis. La administración pre-entrenamiento de 8-OH-DPAT dañó la ingesta de alimento y la exploración, además del aprendizaje. Los presentes resultados sugieren el papel de los receptores 5-HT1A en la consolidación y recuperación del aprendizaje. Tales mejoramientos son independientes de la ingesta de alimentos.

En esa misma línea, usando inyecciones de 8-OH-DPAT pre o post-entrenamiento se estudió: la curva dosis-respuesta de 8-OH-DPAT, animales no privados, privados 24 horas y grupos sobre-entrenados privados y no privados. Otros grupos de animales privados fueron tratados con PCPA (1 X 3 días) y entrenados con la inyección pre o post-entrenamiento del 8-OH-DPAT. Los resultados muestran que la inyección post-entrenamiento mejoró el aprendizaje y lo bloqueó la inyección pre-entrenamiento; ambos efectos fueron dependientes del tiempo. En todos los grupos la inyección pre-entrenamiento del 8-OH-DPAT decrementó la ingesta del estímulo incondicionado (EI), mientras que en los grupos post-entrenamiento no se alteró. En los grupos sobre-entrenados privados, el 8-OH-DPAT no tuvo efectos, y en animales no privados, en forma dependiente de la dosis, mejoró el reaprendizaje y decrementó la ingesta. La PCPA produjo una disminución no significativa en la RC, mientras que coadministrada con

8-OH-DPAT, bloqueó parcial (pre-entrenamiento) o completamente (post-entrenamiento) el aprendizaje. Los resultados muestran que la administración pre-entrenamiento decrementa la ingesta y la exploración, este efecto, en parte, es pre-sináptico. La administración post-entrenamiento mejoró la consolidación mediante una acción pre-sináptica (Meneses, 1993).

Hasta este momento, se ha mencionado la importancia que tienen los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en relación a procesos cognitivos, en determinadas tareas conductuales, del mismo modo que la acción del principal agonista a este receptor, el 8-OH-DPAT. En virtud de que este compuesto no sólo participa en lo ya comentado, es importante señalar otras funciones en las que se encuentra involucrado, sobre todo, en cuanto a la síntesis o liberación de la 5-HT, que a su vez se involucra en otras funciones cognitivas y de retroalimentación y/o regulando otros sistemas neurotransmisores como ya se ha documentado ampliamente en los capítulos anteriores.

El primer paso es el señalar en que otras funciones participa el 8-OH-DPAT, para después presentar un esquema general de los efectos producidos por este compuesto.

En experimentos en donde se valoró la conducta alimenticia en ratas, se encontró que el 8-OH-DPAT inyectado dentro del raquí dorsal o medio a una dosis de 0.125-2 ug produjo un incremento dependiente de la dosis en la ingesta de alimentos en ratas no privadas. El tratamiento previo con haloperidol (0.05 y 0.1 mg/kg, s.c.) atenuó los efectos inducidos por el 8-OH-DPAT en el raquí medio (0.5 ug) complementando los resultados previos con 8-OH-DPAT en el raquí dorsal. El incremento de la ingesta que resultó del tratamiento con 8-OH-DPAT en el raquí dorsal (1 ug) o en el raquí medio (0.5 ug) fue atenuado

por el alfa-fluopenthixol (1.25 y 2.5 ug) inyectado dentro del núcleo acumbens. El alfa-fluopenthixol aplicado en las regiones lateral o ventrolateral del estriado atenúo también la respuesta alimenticia del rafe dorsal, pero no del rafe medio del 8-OH-DPAT. Sin embargo, el alfa-fluopenthixol en la región dorsomedial del estriado fracasó en alterar la conducta alimenticia del 8-OH-DPAT en el rafe dorsal (Fletcher, 1991). A continuación se presenta una tabla en la se resumen los efectos producidos por inyecciones de 8-OH-DPAT en el rafe dorsal, rafe medio, núcleo acumbens y por la inyección sistémica en la rata (Hillegaart, 1991).

8-OH-DPAT

	<u>RD</u>	<u>RM</u>	<u>NAS</u>	<u>Sistémica</u>
actividad locomotora (Documento II, III, V, VII; Carli y Samarin 1988; Cervo y col. 1988)	↓	↑	↓	↓
"postura corporal aplanada" (Documento III, VII; Carli y Samarin 1988; Higgins y col. 1988; Connor y Higgins 1990; Tricklebank y col. 1984)	↑	0	↑	↑
ejecución en rueda de andar (Documento II, VII)	0	0	0	0
comportamiento sexual en rata macho (Documento VII; Ahlenius y col. 1981a)	0	↑	↑	↑
temperatura corporal (Documento VI; Higgins y col. 1988, Hjorth 1985; Goodwin y Green 1985; Goodwin y col. 1987; Hutson y col. 1987)	↓	0	--	↓
conducta alimenticia (Hutson y col. 1986; Bendotti y Samarin 1986; Fletcher y Davies 1990a; Dourish y col. 1985a;b)	↑	↑	--	↑
síntesis de serotonina en el cerebro anterior (Documento IV; Hamon y col. 1988*; Hjorth y Magnusson 1988*; Hutson y col. 1989*; Invernizzi y col. 1991; Hjorth y col. 1982; 1987a; Ahlenius y col. 1989; 1990b)	(↓)	↓	--	↓
liberación de serotonina en el cerebro anterior (Hutson y col. 1989*; Sharp y col. 1989a*; Hjorth y Sharp 1991*)	↓	--	--	↓
efectos cardiovasculares (Connor y Higgins 1990; Gradin y col. 1985; Dabire y col. 1987*)	↓	0	--	↓

Tabla 1 Representación esquemática de los efectos producidos por inyecciones de 8-OH-DPAT dentro del raquí dorsal (RD), el raquí medio (RM), el núcleo acumbens (NAS) y por las inyecciones sistémicas en la rata.

0 sin efecto, ↑ facilitación o incremento, ↓ inhibición o decremento, -- no investigado, \*ratas anestesiadas.

Hillegaart (1991)

FALLA DE ORIGEN

Otras áreas cerebrales que se han explorado. Se estudió el papel de la 5-HT septal lateral en la consolidación de la memoria y que subtipos de receptores se involucran en este proceso. Ratas implantadas con cánulas bilateralmente en el septum lateral fueron entrenadas en tareas de prevención pasiva. Inmediatamente después del entrenamiento, la función serotoninérgica fue manipulada por agentes farmacológicos que bloquearon selectivamente la recaptura de 5-HT (fluoxetina y zimeldine), antagonizando receptores 5-HT<sub>2</sub> (ketanserina y ritanserina) o activando receptores 5-HT<sub>1A</sub> respectivamente. Los resultados indicaron que la infusión directa de fluoxetina dentro del septum lateral con una dosis de 6 ug/0.5 ul y de zimelidina con una dosis de 5 ug/0.5 ul en ambos casos mejoraron marcadamente la memoria. Las inyecciones de ketanserina en el septum lateral (0.3 ug/ul y de 0.5 ug/0.5 ul) y ritanserina (0.3 ug/0.5 ul y de 0.6 ug/ul) no tuvieron un efecto significativo en la memoria por si mismos, y ninguna de estas drogas pudieron atenuar el efecto facilitatorio de la fluoxetina en esta misma área. La infusión de 8-OH-DPAT en el septum lateral a una dosis de 5 ug/ul bloqueó significativamente la retención de la memoria.

Estos descubrimientos en su conjunto, apoyan la tesis de que el núcleo septal lateral en las ratas, está involucrado en los procesos de aprendizaje y memoria en las tareas de prevención pasiva. Además, la activación del receptor post-sináptico 5-HT (no el subtipo 5-HT<sub>2</sub>) probablemente ejerce un efecto facilitatorio, mientras que la activación del receptor pre-sináptico 5-HT<sub>1A</sub> actúa dañando los procesos de consolidación de la memoria, probablemente debido a una inhibición de autorreceptores en la liberación de 5-HT (Lee y col., 1992).



Es importante considerar por otro lado, el papel que juega la serotonina en animales a los que se les ha inducido hipoxia experimental: En un estudio, fueron evaluados los antagonistas a la 5-HT (ketanserina, mianserina, metisergide y cyproheptadine) y los inhibidores de la recaptura (fluoxetine y zimelidina) por su capacidad para proteger los déficits en la ejecución producidos por la hipoxia inducida en tareas de prevención pasiva (PP). La capacidad en las ratas para retener respuestas en la PP se encontró disminuida cuando las concentraciones de oxígeno decrecieron, ocurriendo grandes déficits en la retención a 6.5% de O<sub>2</sub>. Los antagonistas selectivos a 5-HT<sub>2</sub>, la ketanserina (0.01-10.0 mg/kg, s.c.) y la mianserina (0.05-10 mg/kg, s.c.), administrados un minuto después del enternamiento de PP produjeron un incremento en las latencias de retención dosis-dependientes seguidas a una exposición de oxígeno ambiental a 6.5%. Las dosis pico efectivas (PED) para la ketanserina y la mianserina fueron de 3.0 mg/kg, s.c., y de 0.05 mg/kg, s.c., respectivamente. En contraste la metisergida (0.05-30 mg/kg, s.c.) y la cyproheptadina (0.05-7.0 mg/kg, s.c.), antagonistas con más baja afinidad para el subtipo de receptor 5-HT<sub>2</sub>, no fueron efectivos para prevenir la amnesia inducida por la hipoxia. La inhibición de la recaptura de 5-HT fluoxetine (0.01-1.0 mg/kg, s.c.) produce incrementos en la latencia de retención dependientes de la dosis con un PED de 0.05 mg/kg, s.c., mientras que el zimelidina (0.1-10 mg/kg, s.c.), otro inhibidor de la recaptura de 5-HT, no tuvo efecto sobre la amnesia. Los resultados de este estudio sugieren que la modificación de la 5-HT después de la exposición a la hipoxia pueden aminorar un déficit en la ejecución en un modelo animal de aprendizaje y memoria (Strek y col., 1989).

En esta misma línea se ha observado que el linopirdine (Dup 996; 3,3-bis[4-piridinilmetil]-1-fenilindolin-2-one) representa una nueva clase de compuesto que mejora la descarga de la acetilcolina, dopamina y serotonina en cortes de cerebro, mejorando el aprendizaje y la memoria en roedores. El efecto del linopirdine sobre el metabolismo cerebral local de la glucosa fue estudiado por autorradiografía cuantitativa con 2-oxi-D-[1-14C]glucosa. El linopirdine administrado en ratas ingénuas (0.01, 0.1 ó 1.0 mg/kg, s.c.) no alteró significativamente el metabolismo de la glucosa cerebral en algunas de las regiones analizadas. En virtud de que el linopirdine protege de los déficits en la retención en la prevención pasiva, inducidos por la hipoxia en las ratas, se examinaron los efectos del linopirdine sobre el metabolismo cerebral después de que las ratas fueron expuestas a 30 minutos de hipoxia. El metabolismo de la glucosa no fue alterado significativamente después de la exposición a la hipoxia, excepto por un pequeño incremento en algunas regiones cerebrales.

El linopirdine administrado después de la hipoxia disminuyó el metabolismo de la glucosa en el hipocampo, corteza límbica, comisura hipocampal ventral, septum medio, estriado, núcleo subtalámico, zona incerta, habenula lateral, corteza cerebral, vermis cereberal y unos cuantos núcleos talámicos. Efectos estadísticamente significativos del linopirdine sobre el metabolismo de la glucosa se observaron en 22 de 56 muestras de regiones cerebrales. En ratas expuestas a hipoxia, el linopirdine alteró el metabolismo de la glucosa en regiones cerebrales que están implicadas en el aprendizaje y la memoria que están afectadas en la enfermedad de Alzheimer. Diversas de las regiones afectadas están asociadas con el sistema colinérgico y pueden jugar un papel en el mejoramiento de las propiedades cognitivas del linopirdine (Dent y col., 1995).

En otros experimentos la actividad de la 5-HT fue manipulada a través de la inyección periférica de los inhibidores de la recaptura de la serotonina, la fenfluramina y el fluoxetine. Los tratamientos con estas drogas a dosis tan altas como 1 mg/kg produce amnesia retrograda en tareas de aprendizaje apetitivo en un sólo ensayo en las ratas. Un inhibidor no específico de la recaptura de 5-HT, la imipramina, no produjo este efecto amnésico; ni tampoco la combinación de fenfluramina con el MAOI tranilcipromine, aunque produjo como era de esperarse el "síndrome serotoninérgico" (ya explicado antes). Los resultados encontrados empleando el precursor metabólico, el 5-HTP administrado periféricamente, fueron inconsistente, en relación a los efectos amnésicos observados a dosis de 5 y 20 mg/kg peso pero ninguno a 10 mg/kg (Lalonde y Vikis-Freibergs, 1985).

En esta misma línea, se observó que la fluoxetina (FLU) inyectada subcutáneamente mejora la consolidación y la recuperación pero no la adquisición en pruebas aversivas en el ratón adulto joven. La FLU (15 mg/kg) mejoró la retención de la memoria por una semana cuando se inyectó 2 minutos después del entrenamiento. Mejoras similares se obtuvieron con una inyección intraventrúocerebral (20 ug por raton). La FLU mejoró la retención cuando fue administrada previa al entrenamiento (1-5 mg/kg). La FLU (2.5 mg/kg) registró calificaciones de mejoramiento cuando fue inyectada una hora antes de la prueba de retención a la semana, lo que indicó una mejoría sobre la recuperación de la memoria.

Ninguno de los efectos préntrenamiento o pre-prueba dependió del mejoramiento de la adquisición, puesto que el FLU fue incapaz de mejorar la adquisición en la evitación de un choque eléctrico en una prueba con laberinto T, utilizando un rango en la dosis de 0.5-35 mg/kg. El periodo de mayor sensibilidad para el mejoramiento post-en

trenamiento por FLU (15 mg/kg) fue menor que 90 minutos. La amnesia inducida por el inhibidor de la síntesis de proteínas, la anisomicina, o por la droga anticolinérgica escopolamina, fue bloqueada por FLU (15 mg/kg) inyectado post-entrenamiento. Finalmente, el FLU (15 mg/kg) inyectado después del entrenamiento en prevención pasiva de un sólo ensayo, mejoró la retención una semana, mostrando efectividad en esta tarea como en la prevención activa (Flood y Cherkin, 1987).

En otra serie de experimentos se ha estudiado el efecto de la aplicación de la neurotoxina a 5-HT, la 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) para evaluar el aprendizaje y la memoria en roedores utilizando el laberinto acuático de Morris y el laberinto radial. Ratas cachorros de 3 días de edad fueron tratadas con pargyline (40 mg/kg, i.p.) seguida por 5,7-DHT (50 ug/cachorro). A los 75 días de edad, las ratas fueron probadas en las tareas antes mencionadas. En el laberinto acuático de Morris, la latencia para localizar la plataforma escondida no tuvo diferencias significativas en las ratas tratadas con 5,7-DHT y los controles. Similarmente, las ratas tratadas con 5,7-DHT tuvieron una ejecución comparable a los controles en el laberinto radial. A los 106 días de edad, la evaluación de la triptofano-hidroxilasa en el núcleo del rafe dorsal y el hipocampo, mostraron una marcada reducción (86% y 78% respectivamente) en animales tratados con 5,7-DHT comparados con los controles. El análisis inmunohistoquímico fue consistente con los resultados bioquímicos. En los animales tratados con 5,7-DHT hubo mayor pérdida de neuronas que uniones al anticuerpo 5-HT en los núcleos del rafe dorsal y medio (Volpe y col., 1992).

En esta misma línea, en pruebas de prevención pasiva en ratas sujetas a lesiones neuroquímicas del estriado ventral, utilizando las neurotoxinas 6-hidroxidopamina o la 5,7-dihidroxitriptamina, se encontró que sólo aquellas lesiones que disminuyeron el contenido de

dopamina en el estriado ventral, dañaron la conducta post-choque. Las medidas de reactividad al choque por la técnica "Flinch-Jump" indicaron que solamente el agotamiento de serotonina alteró la reactividad al choque. Evaluaciones en el comportamiento locomotor en campo abierto, mostraron que las ratas denervadas de dopamina fueron hipoactivas (se empujaban poco) comparadas con los controles, mientras que las ratas con agotamiento de serotonina fueron hiperactivas. Se concluye que el déficit en la prevención pasiva seguida a la pérdida de dopamina estriatal ventral fue disociada de sus efectos sobre la actividad locomotora (Schwartzing y Carey, 1985).

Por otra parte, se ha visto que la droga (+/-)-3,4-metilenedioxi metanfetamina (MDMA) es tóxica para las neuronas serotoninérgicas centrales; sin embargo, pocas consecuencias funcionales a largo plazo de su neurotoxicidad de MDMA han sido identificadas. Debido a que la 5-HT ha sido implicada en el aprendizaje y la memoria como ya tan ampliamente ha sido explicado, se estudió si a través del daño de las neuronas 5-HT por el MDMA se alteran a largo plazo las funciones mnémicas. Las ratas fueron tratadas con salina, MDMA o 5,7-dihidroxitriptamina/desmetilimipramina. Cuatro semanas después del tratamiento con las drogas arriba señaladas, la memoria fue evaluada en tres diferentes variedades de alternación espacial: 1) la adquisición con un intervalo corto retardado; 2) la adquisición con un intervalo constante y 3) la ejecución con variables agregando un tratamiento con escopolamina. En complemento a los estudios de comportamiento, los efectos neurotóxicos de las drogas fueron evaluados química y anatómicamente. El MDMA, mismo que produce una reducción selectiva y substancial de la 5-HT cerebral no tuvo efectos en cuanto a la precisión de la respuesta en las tareas de alternación espacial. La 5,7-dihidroxitriptamina/desmetilimipramina, la

cual produce una reducción casi total de la 5-HT y una modesta reducción de la norepinefrina, bloqueó la respuesta en las tres variedades de la tarea de alternación espacial. Estos resultados, sugieren que el daño selectivo al sistema 5-HT, del mismo modo que el producido por el MDMA, no es del todo suficiente para dañar la memoria, pero la combinación del daño en los sistemas 5-HT y norepinefrina, pueden alterar la ejecución en las tareas que requieren memoria reciente. Dado que en la enfermedad de Alzheimer el daño involucra a los sistemas de ACh, 5-HT y norepinefrina, el estudio de la interacción de estos sistemas puede proveer un modelo adecuado para el estudio y tratamiento de esta alteración (Ricaurte y col., 1993). A continuación se revisan aspectos importantes de la relación de la serotonina y trastornos neurofisiológicos.

La amplia y extensa información que hemos manejado en esta primera parte, nos muestra que los datos obtenidos en estudios en animales y en humanos indican que la serotonina es un neurotransmisor importante, involucrado en el control de numerosas funciones incluyendo: la agresión, el dolor, la ansiedad, el sueño, la memoria, la conducta alimentaria, la conducta a la adicción, el control de la temperatura, la regulación endócrina y conducta motora. Además, hay evidencias de que las anomalías de las funciones de la 5-HT están relacionadas con la fisiopatología de diversas condiciones neurológicas incluyendo la enfermedad de Parkinson, disquinesia tardía, acatocia, distonia, enfermedad de Huntington, temblor familiar, síndrome de la pierna intranquila, mioclonos, síndrome Gilles de la Tourette, esclerosis múltiple, desordenes del sueño y demencia. Los desordenes psiquiátricos de esquizofrenia, manía, depresión, agresividad y comportamiento de daño a sí mismo, desordenes obsesivos compul-

...sivos, desordenes afectivos temporales, abuso en el consumo de sustancias tóxicas, hipersexualidad, desordenes de ansiedad, bulimia, hiperactividad en la niñez y desordenes en el comportamiento en pacientes geriátricos han sido asociados a deterioros en las funciones centrales de la 5-HT.

El triptofano, precursor en la biosíntesis de la 5-HT, incrementa la síntesis en el cerebro y, por consiguiente, puede estimular la liberación de 5-HT y sus funciones (para mayor detalle, revisar el capítulo I), utilizando el criterio en el sentido de que el triptofano es un constituyente natural de la dieta, muestra baja toxicidad y produce pocos efectos secundarios. Tomando en cuenta lo anterior, los suplementos de triptofano en la dieta han sido usados en el manejo de desordenes neuropsiquiátricos con resultados variables (Sandyk, 1992; ver Altman y Normile, 1988).

En los estudios hechos en la enfermedad de Alzheimer se observa atrofia cerebral cortical, pérdida neuronal, desorganización de neurofibrillas y placas neuríticas. El defecto neurofarmacológico primario involucra la disminución de la actividad de la enzima colina acetiltransferasa que produce disminución en la síntesis de la acetilcolina. También se encuentran involucrados los siguientes neurotransmisores: norepinefrina, dopamina, serotonina y somatostatina como ya se ha comentado antes. La memoria de corto plazo y su inmediata recuperación se encuentran perdidas. Eventualmente, la pérdida de la memoria es tan severa que los pacientes pierden la capacidad de cuidarse por sí mismos. El diagnóstico definitivo de la enfermedad es por autopsia.

En cuanto a su tratamiento se han realizado tres aproximaciones farmacológicas para mejorar la función colinérgica e incluyen:

- 1) el incremento en la producción de ACh por el incremento de sus precursores (lecitina, colina),
- 2) la inhibición de la degradación de ACh por la inhibición de la acetilcolinesterasa (fisostigmina, hidroclorehidro de tacrina) y,
- 3) estimulando directamente receptores colinérgicos usando agentes colinomiméticos (arecolina, RS-86).

Sin embargo, los resultados en estudios que involucran estos agentes es contradictorio: No se ha visto un beneficio consistente en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Si bien la terapia con hidroclorehidro de tacrina ha resultado benéfica en algunos pacientes, esta no ha sido efectiva en todos los casos, además de tener un potencial de efectos adversos. Hasta el momento no existe un tratamiento adecuado para el caso, y por ello, el estudio de los mecanismos que originan la patología es necesario y urgente (Volger, 1991).

En esta misma línea se estudiaron tres nuevas aproximaciones para la modulación de la función de ACh:

- 1) la participación de la somatostatina
- 2) la serotonina, y
- 3) la modulación de la ACh cortical a través de la angiotensina II.

En relación a la somatostatina no existe una correlación entre la disminución de los sitios de unión en el cerebro de la somatostatina y la actividad de la colina acetiltransferasa, lo que no ofrece alternativas terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer. Existen evidencias ya ampliamente comentadas de la importante participación de la 5-HT en la memoria, por lo tanto su estudio y aplicaciones en un futuro son necesarios. En cuanto a la tercera aproximación, evidencias recientes han mostrado que los inhibidores de la



enzima convertidora de angiotensina (ACE) pueden facilitar la liberación de ACh y también poseer un mejoramiento en la actividad cognitiva.

Por otra parte se ha visto que la droga piracetam puede impedir disminuciones en la densidad de receptores de ACh relacionados con la edad. También en relación a factores tróficos (germinaciones neuronales inducidas por glutamato), posiblemente los agonistas a glutamato puedan ser una alternativa potencial. Finalmente, la utilización de trasplantes neuronales es difícil, en virtud de que el daño cerebral es global asociado con la edad y en la enfermedad de Alzheimer (Costall y col., 1990).

Estudios relacionados con el efecto crónico de la administración de 2-pirrolidone acetamida (piracetam) en tareas de prevención pasiva en ratas mostraron un mejoramiento significativo en la retención comparado con los controles que fueron tratados con solución salina. El contenido de noradrenalina, dopamina y serotonina, así como sus metabolitos en el cerebro fueron disminuidos significativamente después de la administración de piracetam. Los niveles de los metabolitos urinarios también fueron disminuidos significativamente. Estos datos indican que el piracetam produjo una disminución en el intercambio de todas las monoaminas centrales y de los receptores de ACh como se señaló arriba. El piracetam no pudo ejercer algún efecto GABAérgico, ya que no hubo cambios en los niveles cerebrales de GABA (Nalini y col., 1992).

En relación a otros neurotransmisores que interactúan con la serotonina, se ha visto que la inyección periférica post-entrenamiento de la sustancia P (SP), facilita la retención en tareas de aprendizaje aversivo y apetitivo. La SP puede modular la liberación de

monoaminas nigroestriatales, mismas que estan relacionadas con aprendizajes de evitación. Se examinó la interacción entre la SP y las monoaminas, observando los efectos de lesiones neuroquímicas sobre la facilitación de retención de tareas de evitación inducida por la SP. Las lesiones experimentales con 5,7-dihidroxitriptamina en la sustancia nigra, pero no en el estriado, atenuaron los efectos de mejoramiento de la retención de la inyección post-entrenamiento de la SP. Además, lesiones con 6-hidroxidopamina en la sustancia nigra produce un déficit en el condicionamiento de evitación que fue revertido con la inyección post-entrenamiento de SP. En los experimentos anteriores se demostró que las inyecciones de SP post-entrenamiento no mostraron cambios significativos en la actividad de la 5-HT de la sustancia nigra. Sin embargo, la sustancia P incrementó la densidad de receptores 5-HT1. Se concluye que la sustancia P puede afectar la retención de evitación al modular la actividad de 5-HT en la sustancia nigra (Pelleymounter y col., 1988).

En otro tipo de experimentos se examinó la influencia de la encefalina en los procesos de elaboración y preservación de reflejos defensivos de evitación bilateral condicionados (CRBA) y reflejos condicionados de prevención pasiva (CRPP) en ratas intactas y en animales a los que se les cambió el estado funcional del sistema serotoninérgico del cerebro. La inyección de encefalina en una dosis de 10 mg/kg en animales intactos, aceleró la elaboración de CRBA sin influenciar su preservación, sin embargo, alteró profundamente la preservación de CRPP. El exceso de serotonina en el cerebro producido por medio de 5-oxitriptofano, previno por completo la aceleración de la elaboración de CRBA por la encefalina bajo las condiciones usuales. La inyección de encefalina actuando sobre la serotonina aumentándola o disminuyéndola en el cerebro, favorece la

la preservación de CRBA. Bajo la influencia de la encefalina, la inclusión de  $^3\text{H}$ tirosina y  $^{14}\text{C}$ lisina en proteínas solubles e insolubles al agua en diferentes estructuras cerebrales disminuyó. Estos resultados testifican la participación del sistema serotoninérgico y las proteínas en el cerebro en relación a los mecanismos de acción de la encefalina en los procesos de aprendizaje y memoria (Kruglikov y col., 1984).

En experimentos recientes, se ha estudiado al antagonista no competitivo al subtipo de receptor afín a NMDA, el MK-801 (dizocilpine) y el antagonista competitivo al subtipo de receptor afín a NMDA, el CGP 37849 (DL- $^{\text{E}}$ -2-amino-4-metil-5-fosfono-3-ácido pentenoico) y su etil ester CGP 39551; comparados en relación a sus efectos neuroquímicos y en el comportamiento en ratas entrenadas en tareas de manipulación de palancas. La dopamina, la serotonina, sus precursores y metabolitos fueron determinados en 14 regiones cerebrales. Además, la adrenalina y la noradrenalina fueron analizadas en el tejido cerebral regional. Cuando el MK 801 y el CGP 37849 fueron administrados en dosis que provocan efectos en el comportamiento parecidos a los de la anfetamina (hiperlocomoción, estereotipias), ambas drogas producen incrementos comparables en el metabolismo de la serotonina y la dopamina en diversas regiones cerebrales e indican que estas alteraciones neuroquímicas fueron mediadas por el subtipo receptor a NMDA. El principal incremento en el intercambio a dopamina fue encontrado en áreas mesolímbicas tales como el núcleo accumbens, mientras que el incremento en el metabolismo de serotonina fue encontrado en el estriado dorsal y en diferentes partes de la corteza cerebral. En contraste, el CGP 39551 difirió del MK 801 y del CGP 37849 conductual y neuroquímicamente. Las tres drogas inducen

cambios en los niveles de adrenalina y/o noradrenalina en algunas regiones cerebrales. Los resultados demostraron que los antagonistas competitivos a NMDA, tales como el CGP 37849, producen activación de las vías dopaminérgicas y serotoninérgicas similares a aquellas causadas por un antagonista no competitivo al subtipo de receptor NMDA (Loscher y col., 1993).

Para concluir esta sección de antecedentes relevantes, señalaremos el papel de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en algunas funciones de aprendizaje y memoria.

Se estudió el efecto de la neurotoxina PCA, el agonista 5-HT<sub>3</sub>, la m-clorofenilbiguanida (mCPBG), los antagonistas a 5-HT<sub>3</sub>; ondansetron (O) y tropisetron (T); los agonistas a 5-HT<sub>4</sub>: el BIMU1 y BIMU8 y el antagonista a 5-HT<sub>4</sub>, el SDZ 205-557 (SDZ). Se empleó una prueba de aprendizaje asociativo, llamada automoldeamiento. Los compuestos fueron inyectados i.p. inmediatamente después de la sesión de entrenamiento y la prueba se realizó 24 horas más tarde.

En el estudio de los agentes 5-HT<sub>4</sub> se inyectaron los compuestos antes o después del aprendizaje. El incremento en el número de respuestas automoldeadas (RCs) se tomó como un aumento en el aprendizaje. Los resultados muestran que la administración de mCPBG (1.0 ó 10.0 mg/kg) disminuyó el número de RC, mientras que en forma dependiente de la dosis el O (0.01-1.0 mg/kg) o el T (0.001-0.1 mg/kg) aumentaron las RCs. Cuando a ratas tratadas con PCA (10 mg/kg durante 2 días) se les inyectó mCPBG, se observó que la PCA no afectó el aprendizaje per se, sin embargo bloqueó el efecto de mCPBG. La administración preentrenamiento de BIMU1 (10.0-30 mg/kg) o BIMU8 (10.0-30.0 mg/kg) facilitó el aprendizaje de la RC, mientras que la administración después del aprendizaje, bloqueó la consolidación del

aprendizaje. La administración de SDZ (1.0-10.0 mg/kg) careció de efecto sobre la consolidación de la RC. El tratamiento con SDZ (10.0 mg/kg) bloqueó el efecto de deterioro en el aprendizaje inducido por la administración post-entrenamiento de los agonistas BIMU1 o BIMU8.

En conclusión, los resultados presentes sugieren que:

- 1) La activación de los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> bloquean la consolidación del aprendizaje;
- 2) El efecto sobre los receptores 5-HT<sub>3</sub> involucra un mecanismo presináptico, localizado en las áreas de proyección serotoninérgicas;
- 3) Los receptores 5-HT<sub>4</sub> facilitan la adquisición pero bloquean la consolidación del aprendizaje (Meneses y Hong, 1994b).

Para concluir esta sección, se valoró la memoria de trabajo investigando los efectos de antagonistas a receptores 5-HT<sub>2</sub> (pirenperone, cinanserin y ritanserin), utilizando un modelo animal de isquemia cerebral en tareas del recorrido de un camino en tres paneles. Un periodo de isquemia de 5 minutos produjo un incremento significativo en el número de errores en la prueba. El pirenperone (0.32 y 1.0 mg/kg), el cinanserin (10 mg/kg) y el ritanserin (3.2 mg/kg) administrados i.p. inmediatamente después del entrenamiento, su presencia en el flujo sanguíneo reduce el incremento de errores esperados a las 24 horas, después de 5 minutos de isquemia. Estos resultados sugieren que el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>2</sub> evita el daño en la memoria de trabajo seguido a la isquemia transitoria del cerebro anterior (Ohno y col., 1991).

## CAPITULO V

## A) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LA HIPOTESIS DE TRABAJO DEL EXPERIMENTO I Y II.

Como ya ha sido ampliamente fundamentado, se ha encontrado que la aplicación de p-cloroanfetamina (PCA) aplicada i.p. produce la liberación endógena de la serotonina (Pletscher y col., 1964; Fuller y Molloy, 1974; Ross, 1976b; Trulson y Jacobs, 1976; Owen y col., 1991; Berger y col., 1992; Fuller, 1992; Martin y Artigas, 1992; Rudnick y Wall, 1992). También se ha encontrado que la liberación de serotonina por la PCA, es antagonizada por el tratamiento previo de un inhibidor de la recaptura de 5-HT; por ejemplo con fluoxetine (Fuller y col., 1974; 1992; Fuller y Snoddy, 1993) y zimildine (Ross, 1976a). Del mismo modo, se ha encontrado que la liberación aguda de 5-HT por la PCA es seguida por una degeneración selectiva y a largo plazo de las terminaciones nerviosas serotoninérgicas, misma que puede ser bloqueada por el inhibidor de la recaptura de 5-HT (Fuller y col., 1975; Harvey y col., 1975; Harvey y McMaster, 1976; Ross, 1976a; 1976b; Harvey y col., 1977; Harvey, 1978).

En otra serie de estudios bioquímicos y conductuales, se ha estudiado el efecto de la PCA en diferentes regiones cerebrales, en donde se encontró una reducción en la 5-HT (Köhler y col., 1978; Johnson y col., 1990; Champney y Matthews, 1991; Mamounas y col., 1991; Dewar y col., 1992). En estudios conductuales de tareas de prevención activa, la adquisición fue severamente retardada cuando se aplicó la PCA (Ögren, 1982). Por otra parte se ha visto que en tareas de prevención activa y pasiva se alteran las concentraciones de 5-HT en el cerebro (Petkov y col., 1989).

En pruebas de condicionamiento aversivo en ratas, se ha encontrado afectada la memoria en las ratas cuando se ha administrado PCA i.p. (Essman, 1974; 1978; Dunn, 1980; Archer, 1982), de igual forma que en pruebas de discriminación (Altman y col., 1989) y todas las señaladas en el capítulo anterior.

Por otra parte, resultan de gran importancia los estudios que Prado-Alcalá y col., se encuentran realizando, en el sentido de valorar el papel que juega el sobrerreforzamiento en tareas de prevención pasiva. Los datos existentes, se refieren al estudio en la vía colinérgica en donde se sabe que la administración intraestriatal o sistémica de bloqueadores muscarínicos que consistentemente producen amnesia, son ineficaces cuando los animales son sobreentrenados en tareas motivadas positivamente o en situaciones de sobrerreforzamiento en la prevención pasiva (Prado-Alcalá y Cobos-Zapiain, 1977; Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Prado-Alcalá y col., 1980; Duran-Arévalo y col., 1990; Quirarte, 1995). De igual forma, en otros experimentos, la escopolamina que normalmente es capaz de producir amnesia en tareas de prevención pasiva, fue inefectiva cuando se utilizaron choques de alta intensidad (sobrerreforzamiento) (Díaz del Guante y col., 1990; 1991; Cruz-Morales y col., 1992; Quirarte, 1995).

El propósito de este experimento fue determinar si la interferencia de la actividad serotoninérgica por la aplicación de la PCA intraperitonealmente o directamente en el estriado, modifica el establecimiento de la memoria a largo plazo, así como el de determinar cual es el efecto del sobrerreforzamiento en la consolidación de la memoria en la vía serotoninérgica.

### HIPOTESIS DEL EXPERIMENTO 1.

- 1.- La aplicación i.p. de la PCA antes del entrenamiento en una tarea de prevención pasiva producirá amnesia en la prueba de la retención, 24 horas después.
- 2.- La utilización de un choque eléctrico de alta intensidad durante el entrenamiento de prevención pasiva (sobrerreforzamiento) no modificará la amnesia inducida por la PCA aplicada i.p., cuando se aplicaron choques eléctricos con menores intensidades.

### METODOS EN EL EXPERIMENTO I.

*Animales.* En relación a los sujetos a los que se les aplicó i.p. la PCA, se utilizaron doscientas veinte ratas machos de la cepa Wistar con pesos entre 250 y 350 gramos. Todas las ratas fueron mantenidas individualmente en cajas de acrílico transparente con acceso libre a alimento sólido y líquido. Manteniéndose en estas condiciones 5 días antes de iniciar los experimentos.

### APARATOS.

La técnica de prevención pasiva se llevó a cabo en una caja de condicionamiento que consta de dos compartimientos de iguales dimensiones (30cm de largo, 30 cm de ancho y 30 cm de altura cada uno), separados por una compuerta oscura tipo guillotina. Tanto las tapas de los compartimientos como la compuerta deslizable se construyeron



con acrílico anaranjado transparente, lo que permite observar el comportamiento de los animales. La tapa de uno de los compartimientos (compartimiento de seguridad, CS) tiene un foco de 10 watts en el centro; en este compartimiento el piso está formado por barras de tubo de aluminio de 0.5 cm de diámetro, separados por una distancia de 1 cm una de otra. En el compartimiento opuesto o de "castigo" (CC), el piso y las paredes laterales están formadas por láminas de acero inoxidable, de tal manera que cada pared se continúa con la mitad del piso; ambas mitades de piso están separadas por una distancia de 1.5 cm.

El piso del compartimiento de castigo está conectado a su vez, a un estimulador de corriente directa y constante. Las mediciones de las latencias y el control de la duración del estímulo nociceptivo se realizó en forma automática con un equipo electromecánico programado por módulos BRS/LVE.

#### **Procedimiento de condicionamiento:**

Durante el entrenamiento, cada animal fue introducido en el compartimiento de seguridad de la cámara de condicionamiento y diez segundos después, la puerta de separación fue abierta; se midió la latencia para pasar al compartimiento de castigo. Una vez en este compartimiento, se cerró la puerta, aplicando un choque eléctrico durante cinco segundos. Empleando los siguientes parámetros; voltaje: 100 Voltios; intensidad: 2.5, 2.6, 3.0, 4.0 y 8.0 mA; duración de los pulsos 50 milisegundos. El choque eléctrico se dio a través del piso y al término de los 5 segundos se abrió la puerta, permitiendo de esta manera que el animal escapará al compartimiento de seguridad.

en donde permaneció allí durante 30 segundos, antes de regresarlo a su jaula individual (también se midió la latencia de escape).

Veinticuatro horas después se midió la retención de la experiencia aversiva. Esta sesión de retención fue realizada de la misma manera que la sesión previa, excepto que no se aplicó el choque eléctrico. Cuando la rata no pasó al compartimiento de castigo en 600 segundos se dió por terminada la sesión, regresando al animal a su jaula.

La cámara de condicionamiento se localizó en el interior de un cuarto oscuro sonoamortiguado, provista de un generador de ruido de fondo.

#### *Tratamientos para el experimento I*

Como ya se explicó, los animales fueron entrenados con 2.5, 2.6, 3.0, 4.0 y 8.0 mA. Para cada intensidad se estudió un grupo íntegro, otro inyectado con solución salina y otro inyectado con p-cloroanfetamina (PCA; 2.5 mg/kg). Grupos adicionales, entrenados con 2.5 mA, fueron tratados con 1.25 ó 1.875 mg/kg de PCA. Las inyecciones fueron aplicadas i.p., 30 minutos antes del entrenamiento o un minuto después del entrenamiento (grupos a los que se les aplicó un choque de 2.5 y 8.0 mA). A otro grupo se le aplicó PCA (2.5 mg/kg) tanto 30 minutos antes del entrenamiento, como 30 minutos antes de la prueba de retención. Tanto en este experimento como en el resto de ellos, todas las drogas fueron disueltas en solución salina isotónica.

En la siguiente tabla se define cada grupo con sus respectivos tratamientos:

TABLA II

## Tratamientos intraperitoneales con PCA y salina

GRUPO	n	inyección	-30 Min E	-30 Min P	+1 Min E
1	10	INTEGRO			
2	10	IP	NaCl		
3	10	IP			NaCl
4	10	IP	PCA 1,25		
5	10	IP	PCA 1,87		
6	10	IP	PCA 2,5		
7	10	IP	PCA 2,5	PCA 2,5	
8	10	IP			PCA 2,5.
Intensidad del choque eléctrico: 2.5 mA.					
9	10	INTEGRO			
10	10	IP	NaCl		
11	10	IP	PCA 2,5		
Intensidad del choque eléctrico: 2,6 mA.					
12	10	INTEGRO			
13	10	IP	NaCl		
14	10	IP	PCA 2,5		
Intensidad del choque eléctrico: 3.0 mA.					
15	10	INTEGRO			
16	10	IP	NaCl		
17	10	IP	PCA 2,5		
Intensidad del choque eléctrico: 4.0 mA.					
18	10	INTEGRO			
19	10	IP	NaCl		
20	10	IP	2,5		
21	10	IP			NaCl
22	10	IP			PCA 2,5
Intensidad del choque eléctrico: 8 mA.					

Las abreviaturas son como sigue: n, tamaño de la muestra; -30 Min E, inyectadas 30 minutos antes del entrenamiento; -30 Min P, inyectadas 30 minutos antes de la prueba; +1 Min E, inyectadas un minuto después del entrenamiento; PCA, p-cloroanfetamina; NaCl, solución salina isotónica; INTEGRO, animales que no recibieron tratamiento; IP, intraperitonealmente; 1.25, 1.87 y 2.5 dosis de PCA expresadas en mg/kg por rata.

### *Estadística empleada*

En virtud de que los datos obtenidos en la prueba de retención no guardaban una distribución normal (debido al nivel de corte de 600 segundos), se utilizaron pruebas no paramétricas para analizar los datos.

Se aplicó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis para comparar la ejecución de los grupos entre sí, con respecto a las latencias de las sesiones de adquisición, escape y retención. En los casos en que se encontraron diferencias significativas, se procedió a comparar cada par de grupos utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

### **RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I**

El análisis estadístico para este primer experimento, se llevó a cabo con 220 ratas como se muestra en la tabla II. En virtud de que se utilizaron diferentes intensidades de choque eléctrico, con el fin de investigar dos fenómenos distintos, pero que guardan una estrecha relación:

- 1) valorar la acción de la p-cloroanfetamina aplicada i.p., en una tarea de prevención pasiva y ver su efecto en la memoria a largo plazo, obteniendo una curva dosis-respuesta.
- 2) valorar el efecto de sobrerreforzamiento, aplicando la PCA i.p. a diferentes intensidades de choque eléctrico en la misma tarea de prevención pasiva.

Por tal razón se hará la presentación de dos gráficas con sus

respectivos resultados estadísticos.

El análisis de varianza mostró que no había diferencias significativas entre los grupos relativas al entrenamiento y los tiempos de latencia de escape.

La prueba de Kruskal-Wallis demostró que había diferencias altamente significativas en la retención entre los grupos, que no recibieron altas intensidades de choque. Por ello, a intensidades normales y revisando por separado a cada gráfica tenemos que:

En el caso de los grupos a los que se les aplicó una intensidad de choque eléctrico de 2.5 mA, observamos claramente una curva dosis-respuesta. La prueba de Kruskal-Wallis demostró que había diferencias altamente significativas en la retención entre los grupos ( $H = 25.1443$ ,  $gl = 7$ ,  $P = 0.007$ ).

Diferencias significativas fueron encontradas después de comparar la ejecución de los grupos (íntegro, y los controles inyectados con salina, así como a los que se les aplicó una dosis baja de PCA) frente a los grupos restantes a los que se les aplicó una dosis de PCA de 2.5 mg/kg. Estos resultados están representados en la figura 6.

En la figura 7, en donde se representan los resultados para intensidades de choque altas (sobrerreforzamiento), encontramos que la prueba de Kruskal-Wallis difirió de la manera siguiente:

- a) intensidad de 2.5 mA ( $H = 15.4360$ ,  $gl = 2$ ,  $P = 0.01$ )
- b) intensidad de 2.6 mA ( $H = 8.577$ ,  $gl = 2$ ,  $P = 0.03$ )
- c) intensidad de 3.0 mA ( $H = 6.777$ ,  $gl = 2$ ,  $P = 0.05$ )
- d) intensidad de 4.0 mA ( $H = 4.182$ ,  $gl = 2$ ,  $P = NS$ )
- e) intensidad de 8.0 mA ( $H = 5.646$ ,  $gl = 2$ ,  $P = NS$ )

A todos los grupos se les aplicó una dosis de PCA de 2.5 mg/kg.

El promedio de latencias de los grupos íntegro y los inyectados con salina no difirieron respecto a los inyectados con dosis amnés-

...cas de PCA (2.5 mg/kg, i.p.) y que fueron sobrerreforzados (grupos con intensidades de choque eléctrico de 4.0 y 8.0 mA, respectivamente), estadísticamente no presentaron diferencias significativas; no se encontró amnesia cuando la PCA se aplicó 30 minutos antes del entrenamiento, como cuando se aplicó un minuto después del entrenamiento para el grupo que recibió un choque de 8.0 mA.

En las siguientes páginas se presentan las gráficas que corresponden a los resultados antes mencionados (figuras 6 y 7).

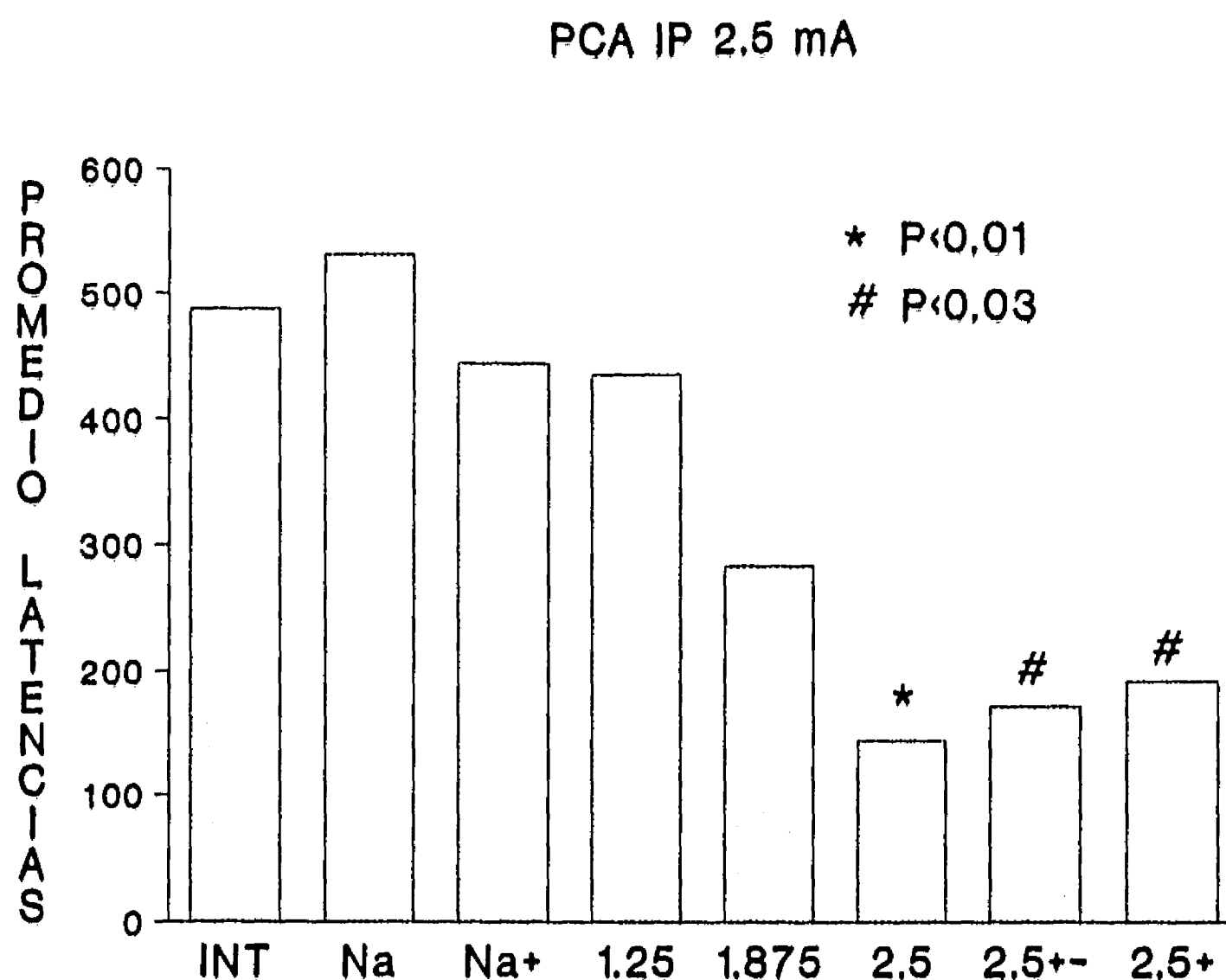


Figura 6

Promedio de latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento. Las abreviaturas son las siguientes: INT, grupo íntegro; Na, animales a los que se les aplicó solución salina isotónica, 30 minutos antes del entrenamiento; Na+, animales a los que se les aplicó solución salina isotónica, un minuto después del entrenamiento; 1.25, 1.875, 2.5, animales inyectados con 1.25, 1.875 y 2.5 mg/kg de PCA 30 minutos antes del entrenamiento; 2.5+-, animales a los que se les aplicó 2.5 mg/kg de PCA, 30 minutos antes del entrenamiento y 30 minutos antes de la prueba de retención; 2.5+, animales a los que se les aplicó 2.5 mg/kg de PCA un minuto después del entrenamiento.

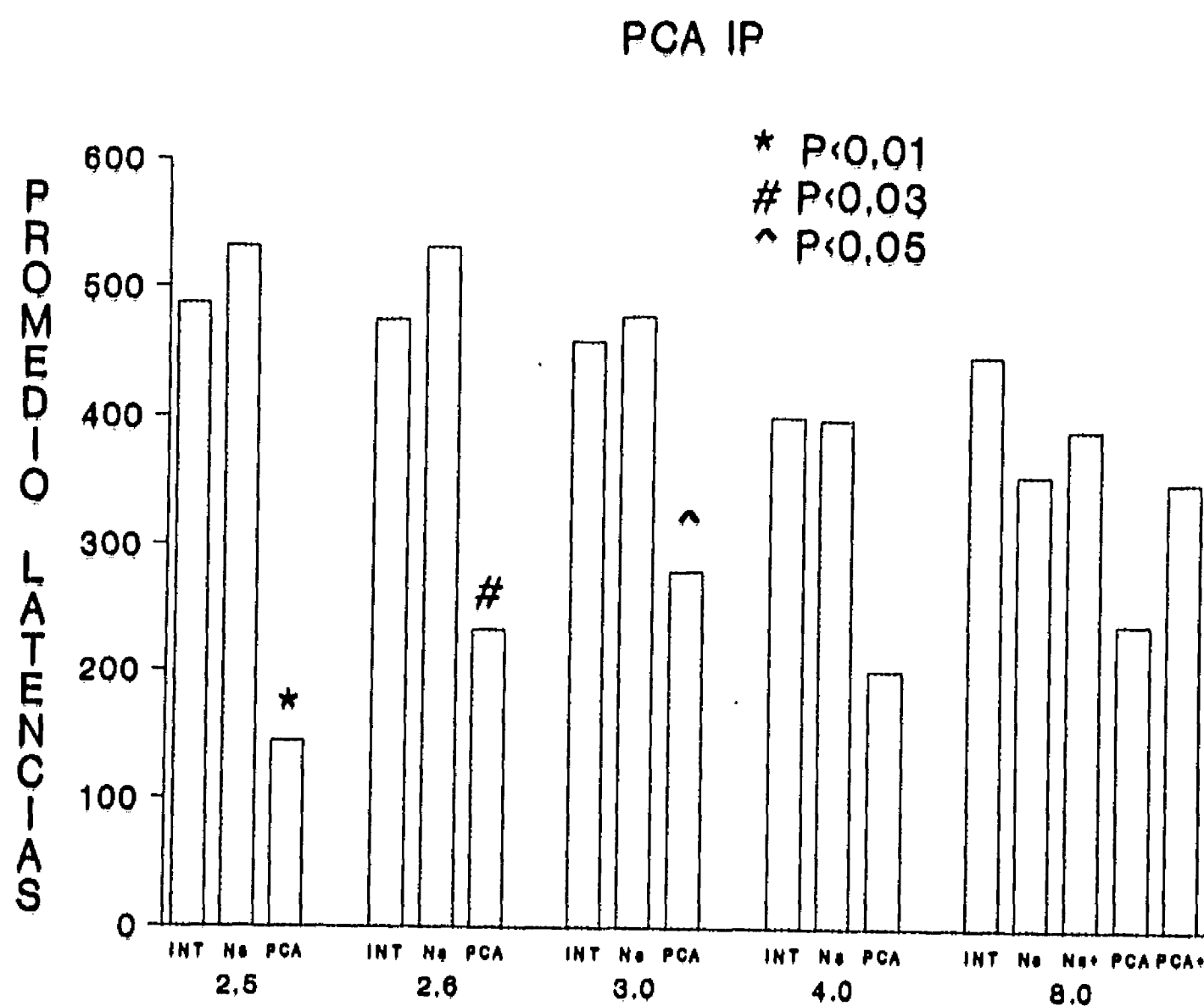


Figura 7

Promedio de las latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento. Las abreviaturas son las siguientes: INT, grupo íntegro; Na, animales a los que se les aplicó solución salina isotónica 30 minutos antes del entrenamiento; PCA, animales a los que se les aplicó 2.5 mg/kg de PCA 30 minutos antes del entrenamiento; Na+, animales a los que se les aplicó solución salina isotónica un minuto después del entrenamiento; PCA+, animales a los que se les aplicó 2.5 mg/kg de PCA un minuto después del entrenamiento. 2.5, 2.6, 3.0, 4.0 y 8.0 intensidad del choque eléctrico en mA, durante el entrenamiento.



## HIPOTESIS DEL EXPERIMENTO II

- 1.- La aplicación intraestriatal de la PCA a diferentes tiempos antes del entrenamiento producirá amnesia en la prueba de retención 24 horas después.

## METODOS EN EL EXPERIMENTO II

*Animales.* Para este experimento, se utilizarón 75 ratas machos con las mismas características ya mencionadas.

## CIRUGIA EN EL EXPERIMENTO II

A las 60 ratas que fueron operadas, se les implantó bilateralmente, cánulas de doble pared, construidas con tubos de acero inoxidable de 12 mm de longitud. La pared externa de la cánula se fabricó con tubo de aguja hipodérmica del Nº 21, y la pared interna que servía de tapa, con tubo de aguja dental del Nº 27.

Para los fines quirúrgicos se anestesiaron los sujetos inyectando intraperitonealmente (i.p.) pentobarbital sódico (40 mg/kg) disuelto en solución salina isotónica que contenía atropina (0.2 mg/kg). Al terminar la implantación se inyectó i.m. 0.5 ml de benzeta-cil (150 000 U) para prevenir las infecciones post-operatorias.

La cirugía se efectuó en un aparato estereotáxico con el cuidado que requiere la técnica. Se procedió a efectuar una incisión de aproximadamente 2 cm de longitud en sentido anteroposterior de la piel del cráneo, previamente rasurada y limpiada con benzal hasta llegar al hueso.

Se realizó una perforación superficial en el hueso frontal y

otra en la región posterior del hueso parietal, con el objeto de colocar dos tornillos. Después se levantó el tejido perióstico para realizar dos orificios en el hueso, respetando la duramadre, misma que delicadamente fue perforada evitando dañar el tejido cerebral. La colocación de los tornillos sirvieron para anclar las cánulas implantadas, para ello se utilizó cemento acrílico.

Las coordenadas que se emplearon en la implantación en el estriado en la región anterodorsal fueron: A = 9 mm, L = 3 mm, H = -3.5 mm. Estas coordenadas corresponden a las descritas por Paxinos y Watson (1982).

Después de la implantación, se les dió a los sujetos experimentales de 6 a 8 días de recuperación, antes de realizar el entrenamiento de prevención pasiva.

Los aparatos y el procedimiento de condicionamiento que se utilizaron para este experimento, se describieron para el experimento 1, lo único que varió fue la intensidad del choque que para todos los animales operados y no operados de estos grupos fue de 4 mA.

#### **Procedimiento de microinyección:**

Para aquellas ratas que fueron inyectadas intraestriatalmente, se utilizó una bomba de perfusión lenta marca SAGE, acoplada a dos microjeringas Hamilton de 50 microlitros, conectadas a través de tubos de polietileno calibre PE-20 a inyectoros de la misma longitud y diámetro que la cánula interna que servía de tapón. El sistema era lavado y purgado antes y después de cada aplicación del tratamiento utilizando alcohol y agua destilada esterilizada, en ese orden. Durante la aplicación de la sustancia empleada, para cada uno de los animales de prueba, se verificaba la permeabilidad en

el sistema antes de proceder a su aplicación. En todos los casos, se inyectó un volumen de 1  $\mu$ l en un minuto.

### Tratamientos en el experimento II

Los tratamientos aplicados intraestriatalmente, fueron los siguientes; un grupo íntegro que no recibió tratamiento; un grupo al que se le aplicó solución salina isotónica 5 minutos antes de la sesión de adquisición; y cuatro grupos a los que se les aplicó 5  $\mu$ g de PCA; 30, 15 y 5 minutos antes del entrenamiento y el grupo adicional al que se le administró la misma dosis de 5  $\mu$ g de PCA 5 minutos antes del entrenamiento y 5 minutos antes de la prueba de retención.

En la Tabla III, se define cada grupo con sus respectivos tratamientos.

TABLA III

#### Tratamientos intraestriatales con PCA y salina

GRUPO		n	inyección	- 30 Min E	- 15 Min E	- 5 Min E	- 5 Min P
4 mA	1	15	INTEGRO				
	2	11	ESTRIADO			NaCl	
	3	11	ESTRIADO	PCA 5 $\mu$ g/1 $\mu$ l			
	4	9	ESTRIADO		PCA 5 $\mu$ g/1 $\mu$ l		
	5	10	ESTRIADO			PCA 5 $\mu$ g/1 $\mu$ l	
	6	13	ESTRIADO			PCA 5 $\mu$ g/1 $\mu$ l	PCA 5 $\mu$ g/1 $\mu$ l

Las abreviaturas son como sigue: n, tamaño de la muestra; -30 Min E, inyectadas 30 minutos antes del entrenamiento; -15 Min E, inyectadas 15 minutos antes del entrenamiento; -5 Min E, inyectadas 5 minutos antes del entrenamiento; -5 Min P, inyectadas 5 minutos antes de la prueba de retención; PCA, p-cloroanfetamina; NaCl, solución salina isotónica; INTEGRO, animales que no recibieron tratamiento; 4 mA, intensidad del choque eléctrico para todos los grupos.

### *Histología del experimento II*

*Una vez terminados los experimentos, los cerebros de los animales sometidos a la implantación de cánulas, fueron estudiados histológicamente, considerándose como válidos aquellos en los que las puntas de cada cánula se encontraron en la parte anterodorsal del estriado.*

*La técnica fue la siguiente:*

*Bajo el efecto de anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), se efectuó una incisión en el tórax, dejando al descubierto el corazón e introduciendo una aguja en el ventrículo izquierdo haciendo a su vez una insición en la aurícula derecha. A través de la aguja se inyectó solución salina isotónica para lavar el tejido, inyectando después una solución de formol al 10% hasta obtener rigidez muscular.*

*Posteriormente se decapitó al sujeto experimental, se extrajo el cerebro evitando dañarlo, guardándose en formol al 10%, por una semana, al cabo de la cual se realizaron cortes coronales de 50 micras de espesor, utilizando un microtomo de congelación. Finalmente, los cortes fueron fijados y teñidos de acuerdo a la técnica de Nissl.*

*Estadística: La estadística empleada fue la misma que se utilizó para el experimento I.*

### *RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II*

*Seis animales fueron descartados, debido a que la situación de las cánulas para aquellos sujetos que fueron implantados, se encontraban asimétricas o fuera del área blanco; consecuentemente, el*

análisis estadístico se llevo a cabo con los datos obtenidos de 69 ratas a las que se les ubicó en los grupos que recibieron PCA intraestriatal. Las puntas de las cánulas de los grupos estriatales de este experimento, así como los del experimento 3 fueron localizadas en la región anterodorsal del estriado (Figura 8).

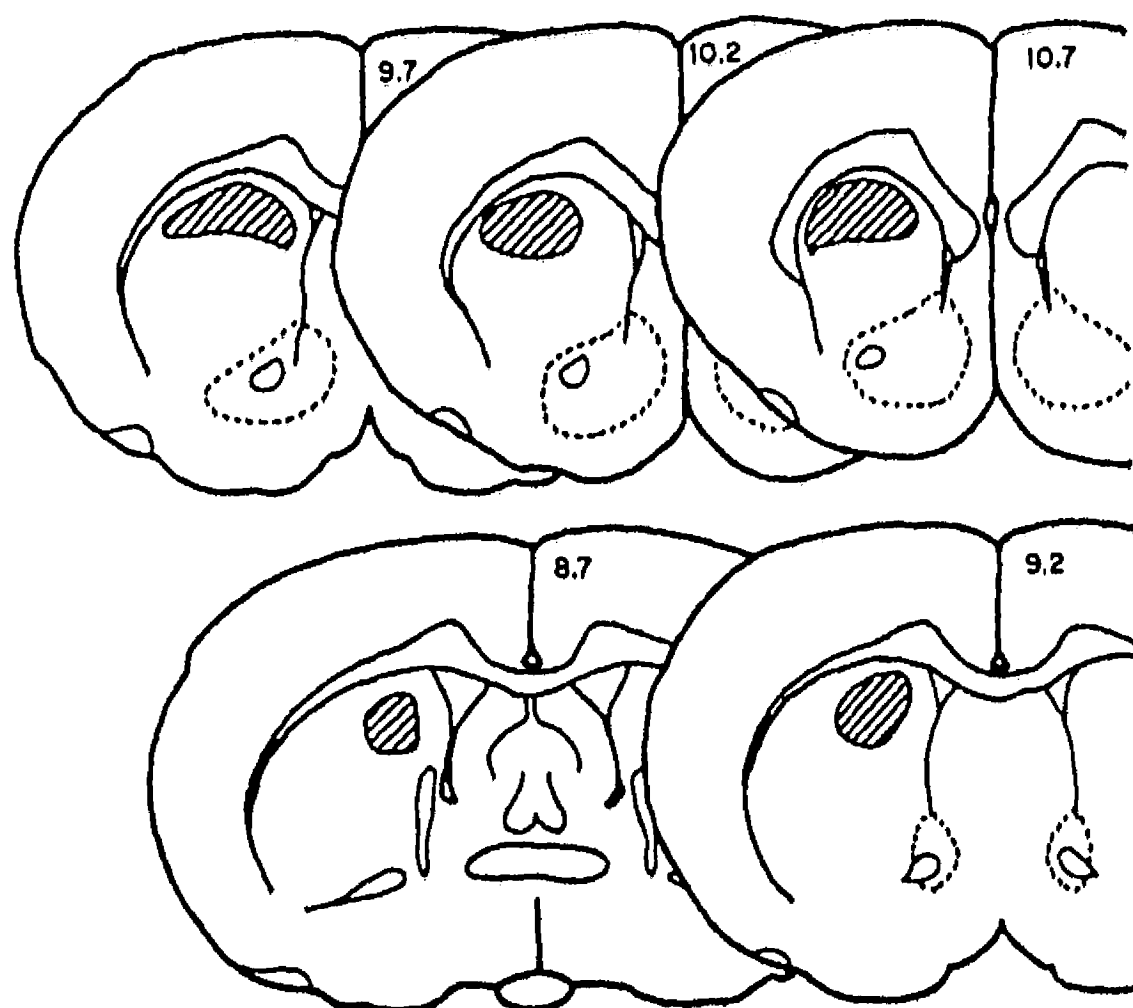


Figura 8

Representación diagramática de secciones histológicas, modificadas de Paxinos y Watson (1982). Las áreas sombreadas representan la extensión de la localización de las puntas de las cánulas en el estriado anterior. Sólo se representan las cánulas situadas en el hemisferio derecho.

El análisis de varianza mostró que no había diferencias significativas entre los grupos relativos al entrenamiento y los tiempos de latencia de escape.

La prueba de Kruskal-Wallis demostró que había diferencias altamente significativas en la retención entre los grupos ( $H = 16.227$ ,  $gl = 5$ ,  $P = 0.0062$ ). Los grupos a los que se les aplicó una dosis de PCA (5 ug/ul, en un minuto) 5 minutos antes del entrenamiento y

aquel al que se le aplicó la misma dosis de PCA 5 minutos antes del entrenamiento y 5 minutos antes de la prueba de retención, difirieron de el integro, el que recibió salina y aquellos a los que se les aplicó la misma dosis de PCA 30 y 15 minutos antes del entrenamiento. En la gráfica observamos claramente una curva tiempo-dependiente para la aplicación de PCA estriatalmente.

### PCA ESTRIATAL

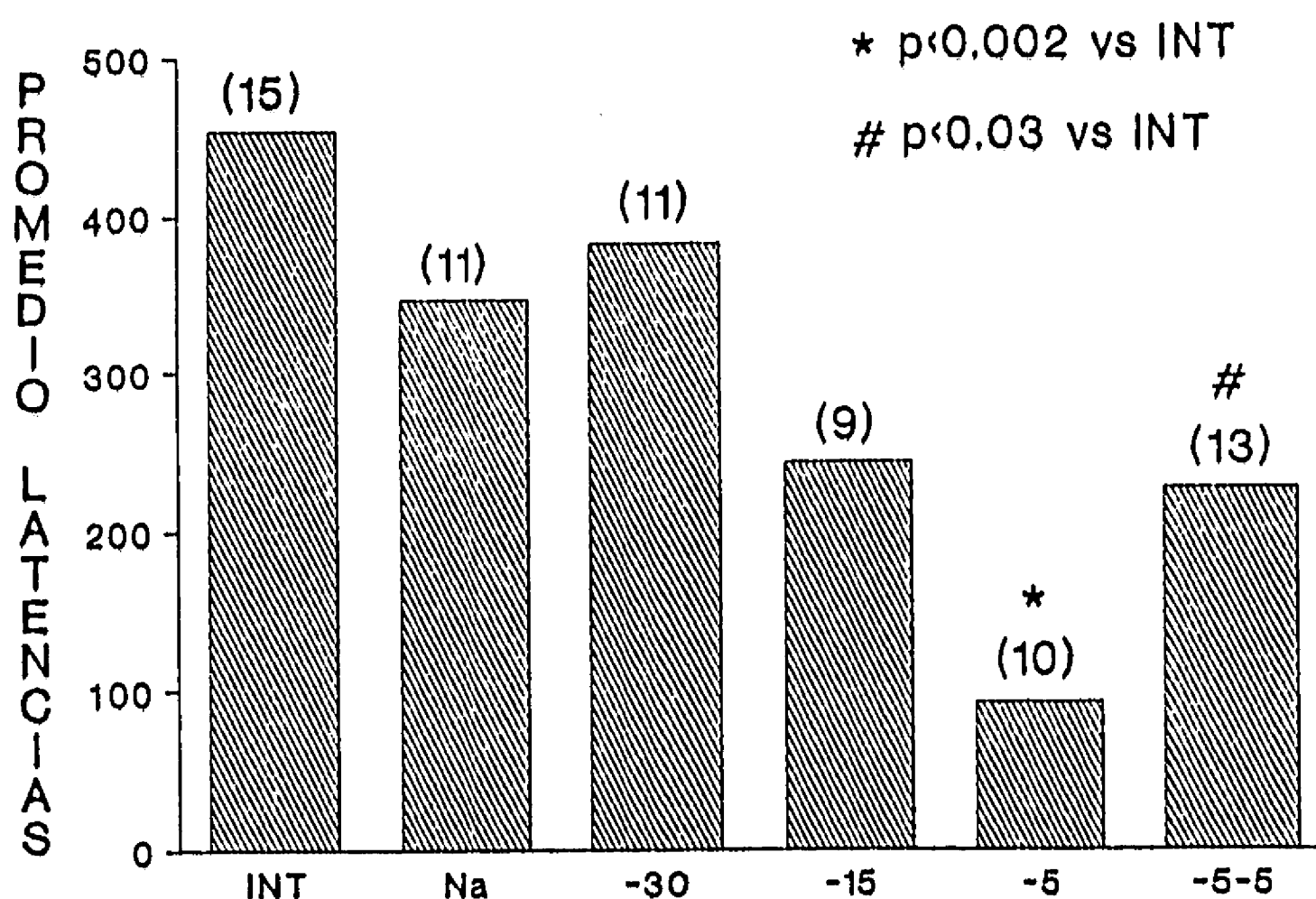


Figura 9

Promedio de las latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento. Las abreviaturas son las siguientes: INT, grupo integro; Na, animales a los que se les aplicó 1 ul de solución salina isotónica 5 minutos antes del entrenamiento; -30, animales a los que se les aplicó 5 ug/ul de PCA 30 minutos antes del entrenamiento; -15, animales a los que se les aplicó 5ug/ul de PCA 15 minutos antes del entrenamiento; -5, animales a los que se les aplicó 5 ug/ul de PCA 5 minutos antes del entrenamiento; -5-5, animales a los que se les aplicó 5 ug/ul de PCA tanto 5 minutos antes del entrenamiento como 5 minutos antes de la prueba de retención; ( ), los números en el interior de cada paréntesis sobre las barras significa el número de sujetos por grupo. La intensidad del choque eléctrico fue de 4 mA.

## DISCUSION DEL EXPERIMENTO I Y II

Este es el primer reporte en donde se estudia el efecto del sobre rreforzamiento en una tarea de prevención pasiva, aplicando p-cloro anfetamina i.p., así como aplicada directamente en el estriado. Hasta estas fechas, los datos existentes acerca de los efectos de la serotonina sobre el aprendizaje y la memoria son inconsistentes. Los estudios que se han realizado utilizando el paradigma de prevención activa aportan resultados contradictorios: la inhibición de la síntesis de 5-HT en ratas utilizando la p-clorofenilalanina en algunos casos facilita (Brody, 1979), impide (Valzelli y Pawlowski, 1979) o no afecta (Köhler y Lorens, 1978) el aprendizaje. Por otra parte, también se ha encontrado que cuando se aplican antagonistas a 5-HT algunos reportan que el efecto es de mejoramiento de la memoria (Wetzel y col., 1980; Altman y Normile, 1986) o que se deteriora (Bammer, 1982; Kubo y col., 1988).

Actualmente se sabe que las drogas que inhiben la recaptura de la 5-HT en las terminales nerviosas presinápticas, presumiblemente incrementan la transmisión serotoninérgica por el aumento de la concentración sináptica de 5-HT. Como se ha mencionado antes, el tratamiento con alaproclate y zemelidina facilitaron la recuperación del aprendizaje en pruebas de evitación aversiva (Altman y col., 1984). También en aquellos casos en los que se administró fluoxetina se encontró mejoramiento en la memoria en tareas en las que se utilizó laberinto en T (Flood y Cherkin, 1987), de igual forma que cuando el fluoxetina se administró post-entrenamiento para prevenir el déficit en la ejecución en una tarea de prevención pasiva producido por la hipoxia (Strek y col., 1989).

En otros experimentos se ha hecho evidente que la aplicación *i.p.*, de la PCA produce la liberación de la serotonina en el sistema nervioso central (Meyer y col., 1991), y también se ha encontrado que la aplicación sistémica de PCA en pruebas de prevención pasiva, antagoniza el efecto anti-amnésico del minaprine sobre el daño a la memoria inducido por la ciclohexamida, situación parecida cuando es administrado el 5-hidroxitriptófano en pruebas de prevención pasiva (Nabeshima y col., 1989b). En otra amplia serie de experimentos como ya han sido descritos, se encontró que la aplicación de la PCA en pruebas de prevención pasiva y activa altera significativamente el aprendizaje y la memoria (Ögren, 1985; 1986a; 1986b).

Por otra parte y como ya se comentó, existen reportes en los cuales se ha visto que la PCA actúa modificando la interacción de los sistemas colinérgico y serotoninérgico lo que repercute en diferente tipo de tareas en donde se estudia el aprendizaje y la memoria (Sakurai y Wenk, 1990; Normile y col., 1989). También se ha encontrado en experimentos en los que se estudia el efecto del LSD en tareas discriminatoria, que la PCA *i.p.*, produce una disminución de la 5-HT (White y col., 1980).

Todos estos reportes en su conjunto, muestran el efecto que tiene la PCA sobre el aprendizaje y la memoria, a través de su acción en cuanto al agotamiento de la serotonina en el sistema nervioso central.

En estos experimentos, observamos claramente cómo se involucra la serotonina en la consolidación de la memoria en una tarea de prevención pasiva, ya que cuando se administró la PCA a diferentes dosis intraperitoneales, encontramos un efecto amnésico dosis-respuesta.

Dado que los grupos fueron tratados con PCA y entrenados bajo la influencia de la droga, se podría argumentar que el déficit de la



ejecución mostrado por estos animales, fue causado por interferencias con funciones no asociativas (exceptuando los grupos control y a los que se les aplicó después del entrenamiento i.p.). Esta posibilidad parece improbable, porque durante el entrenamiento no hubo diferencias significativas entre las latencias de los grupos entrenados para pasar al compartimiento de castigo; es decir, todos los grupos mostraron la misma ejecución motora. Por el mismo tenor, no hubo diferencias en las latencias de escape entre los grupos; estos resultados indican que la capacidad para reaccionar al choque eléctrico es la misma para todos los grupos. Además se apoya la idea de que la aplicación tanto sistémica de la PCA (i.p.) como su aplicación directa intraestriatal coincide en los resultados obtenidos. Estos resultados y aquellos derivados de los grupos controles de estado-dependencia, sugieren firmemente que los déficits producidos en la ejecución por la PCA, fueron debidos a alteraciones en la vía serotoninérgica, interfiriendo con los procesos de memoria.

Una aportación importante a partir de los resultados encontrados en estos experimentos, es sin lugar a dudas, el hallazgo de que el agotamiento de la serotonina estriatal por la PCA, proxima al entrenamiento (5 minutos antes de la tarea) produjo un importante estado amnésico cuando se realizó la prueba de la retención de la tarea 24 horas después, lo que indica el importante papel regulador de la serotonina en la retención y consolidación de la memoria. Previamente las inferencias al respecto se sustentaban en efectos inespecíficos, cuando la PCA se aplicaba sistémicamente, o por otra parte, se han hecho enfoques parciales de la importancia funcional en forma indirecta, considerando estructuras como el rafé dorsal, hipocampo o corteza.

Por otra parte y en relación al sobrerreforzamiento, podemos decir lo siguiente:

- A) Las dosis de PCA (2,5 mg/kg, i.p.) que producen amnesia en tareas de prevención pasiva a intensidades de choque bajas (2.5, 2.6 y 3.0 mA), no tuvieron ningún efecto cuando la intensidad del choque eléctrico se vio sobrerreforzada (4.0 y 8.0 mA) y la aplicación de la PCA i.p., fue 30 minutos antes del entrenamiento o un minuto después del entrenamiento. No existieron estadísticamente diferencias significativas entre estos grupos cuando se compararon a los controles (ver figura 7).
- B) Tomando en cuenta los resultados anteriores podemos concluir, que el sistema serotoninérgico no tiene una participación importante en tareas mediadas con un sobrerreforzamiento, dado que la PCA que agota a la serotonina y que este neurotransmisor actúa sobre la memoria a largo plazo en condiciones no sobrerreforzadas como ha sido probado en éstos y otros experimentos; cuando se incrementaron las intensidades del choque eléctrico la PCA no tuvo efectos importantes sobre la tarea. Tampoco podemos considerar que el sobrerreforzamiento acelerará la consolidación de la memoria, puesto que la aplicación de la PCA un minuto después del choque de 8.0 mA o 30 minutos antes de la aplicación del choque no mostró diferencias entre estos grupos entre sí o respecto a los controles (ver figura 7).

Para terminar esta discusión, cuando la intensidad del choque fue de 2.5 mA y se administraron diferentes dosis de PCA, se obtuvo una curva dosis-respuesta (ver figura 6).

## CAPITULO VI

B) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LA  
HIPOTESIS DE TRABAJO DEL EXPERIMENTO III

Gran parte de los datos experimentales anteriormente señalados, sugieren que la serotonina juega un papel importante en los procesos fundamentales de aprendizaje y memoria en animales (ver Ögren, 1982a). También, como ya es conocido, a diferencia de otros neurotransmisores tales como la acetilcolina (Deutsch, 1973), norepinefrina (Dismukes y Dake, 1972; Quartermain, 1982), o dopamina (Quartermain y Altman, 1982; Altman y Quartermain, 1983), el sistema serotoninérgico se ha encontrado que puede ocasionar lo siguiente: deteriorar el aprendizaje y la memoria (Essman, 1973a; Wetzel y col., 1980; Ögren y col., 1981; Ögren, 1982) o interfiere con frecuencia el aprendizaje y la memoria (Brody, 1970; Lorens, 1973; Vorhees y col., 1975; Wetzel y col., 1980). En otros casos se han reportado resultados ambiguos en cuanto al mejoramiento o deterioro del aprendizaje y la memoria por la serotonina (Hole y col., 1976; Lorens, 1978; Ögren y col., 1981).

Por otra parte se han hecho una gran cantidad de estudios que van desde la regulación de la biosíntesis de la serotonina y su papel cerebral (Mandell y Knapp, 1977), y aquellos casos en los que la estimulación aguda del sistema serotoninérgico consistentemente interfiere con el aprendizaje en una gran variedad de paradigmas conductuales (Joyce y Hurwits, 1964; Essman, 1973; Fibiger y col., 1978; Ögren, 1982b).

Existen evidencias experimentales en las que se ha encontrado que el efecto posiblemente en diferentes estructuras cerebrales de la serotonina parece ser de naturaleza inhibitoria (Haigler y Agajanian, 1974). La comparación de los resultados electrofisiológicos con los perfiles farmacológicos de dos de sus sitios de acción (5-HT1 y 5-HT2) ha llevado a Peroutka y col., (1981) a considerar que los receptores 5-HT1 representan los sitios que median los efectos inhibitorios de la 5-HT, mientras que los receptores 5-HT2 representan aquellos sitios que median los efectos excitatorios de 5-HT. Por ello, puede ser atractiva la hipótesis en el sentido de que los receptores 5-HT2 o eliminan o disminuyen en gran parte el tono inhibitorio que el sistema nervioso serotoninérgico se cree esta ejerciendo en el cerebro (Harvey y col., 1986).

Por otra parte existen evidencias que indican la interacción funcional entre los sistemas serotoninérgico y colinérgico en el cerebro (Goodman y Weiss, 1973; Haubrich y Reid, 1972; Ladinsky y col., 1977). Por ejemplo, tratamientos con agonistas a 5-HT, como el quipazine y la D-fenfluramina, inducen incrementos marcados de ACh en el estriado y el hipocampo (Euvard y col., 1977; Ladinsky y col., 1981; Samanin y col., 1978). También; lesiones de neuronas 5-HT cerebrales por 5,7-dihidroxitriptamina han mostrado incrementar el intercambio de ACh en algunas regiones cerebrales (Robinson, 1983). Hay evidencias que sugieren que las neuronas colinérgicas y serotoninérgicas existen en estrecha proximidad en diversas regiones cerebrales (Azmitia, 1976; Van Der Kooy y Hattori, 1980).

Hay evidencias adicionales en el sentido de la existencia de una interacción funcional entre los sistemas neuronales colinérgico y serotoninérgico (Quirion y col., 1985; Robinson, 1983; Wenk y English, 1986) que sugiere que la interacción es relevante en procesos de

aprendizaje y memoria, que debe considerarse en la etiología y tratamiento de los daños en la memoria asociados con desordenes en el comportamiento relativos a la edad (Decker y McGaugh; Fillion y col., 1991; Nilsson y col., 1988; Normile y Altman, 1987; Richter-Levin y Segal, 1989a; Robinson, 1983).

También se han examinado los efectos combinados en la manipulación de la 5-HT y la ACh en procesos de aprendizaje y memoria (Altman y Normile, 1987; Altman y col., 1987; Vanderwolf, 1987). Por ejemplo, se ha visto que la administración antes de la prueba de agonistas colinérgicos muscarínicos como la oxotremorina (Altman, 1983; Flood y col., 1985) y los bloqueadores de la recaptura de serotonina alaproclate (Altman, 1985; Altman y col., 1984) pueden mejorar la recuperación de un hábito aversivo previamente aprendido (Harvey y col., 1987).

Los resultados antes señalados apoyan la consideración de que en el estriado puede darse una interacción entre los sistemas serotoninérgico y colinérgico y de este modo participar en procesos de aprendizaje y memoria como previamente se ha señalado. Los resultados del experimento II de esta tesis demostraron que la serotonina estriatal juega un papel importante en la retención y consolidación de una tarea de prevención pasiva, ya que la aplicación en el estriado de PCA, produjo un efecto amnésico tiempo-dependiente. Sin embargo estos hechos no permitieron definir el tipo de receptor a 5-HT involucrado.

Con el propósito de conocer cual de los subtipos de receptor a 5-HT en el estriado participa regulando los procesos de aprendizaje y memoria, por tal motivo, el propósito de este experimento fue determinar si los receptores 5-HT<sub>2</sub> juegan algún papel en la retención de una tarea de prevención pasiva.

### HIPOTESIS DEL EXPERIMENTO III

*"El bloqueo específico de los receptores 5-HT<sub>2</sub> en el estriado, producirá amnesia en una tarea de prevención pasiva"*

Para este experimento, se utilizaron 15 ratas integras y 9 que fueron operadas e inyectadas con salina como controles; sendos grupos se ubicaron en los grupos intraestriatales que fueron inyectados con mianserina y ketanserina respectivamente y que hicieron 154 sujetos que sumados a los anteriores dieron un total de 178. La cirugía, aparatos, procedimiento de condicionamiento y de microinyección, así como las estadísticas no difirieron en relación a lo ya descrito, excepto en las dos siguientes situaciones:

1.- La microinyección intraestriatal se realizó de un minuto y medio a dos minutos después del entrenamiento.

2.- Se agregó un grupo control operado en la corteza parietal, utilizando las siguientes coordenadas: A = 9mm, L = 3 mm y H = -0.5 mm que corresponden a las descritas por Paxinos y Watson (1982).

#### **Tratamientos:**

Se aplicaron diferentes dosis de mianserina en el estriado de grupos independientes (0.025, 0.05, 0.20, 0.80, 3.0 y 6.0 ug respectivamente); a un grupo adicional se le aplicó solución salina isotónica y un grupo integro al que no se le aplicó tratamiento (Figura 11).

Por otra parte, también se aplicaron diferentes dosis de ketanserina en el estriado de grupos independientes (0.0005, 0.004, 0.002,

0,001, 0,04 y 1,4 ug respectivamente), a un grupo adicional se le aplicó solución salina isotónica y un grupo íntegro al que no se le aplicó tratamiento. Por último, al grupo implantado en la corteza parietal se le aplicó 0,8 ug de mianserina más 0,04 ug de ketanserina. Todos los grupos a los que se les aplicó mianserina, ketanserina y solución salina isotónica fueron inyectados bilateralmente intraes-trialmente, excepto el de corteza y los íntegros.

La histología para estos grupos se efectuó de la misma manera como ya se ha explicado antes.

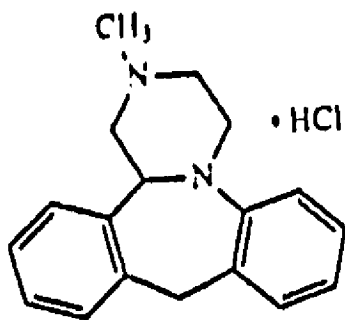
La mianserina y la ketanserina se utilizaron por las siguientes razones:

Como ya se ha señalado en su oportunidad y documentado ampliamente, la mianserina y la ketanserina son dos compuestos orgánicos cíclicos, que tienen la propiedad entre muchas otras funciones, de ser bloqueadores de receptores serotoninérgicos, mismos que han sido utilizados en muchas investigaciones conductuales. Para comprender mejor los mecanismos de acción de estos compuestos, se describirán sus principales propiedades:

**Mianserina:** 1,2,3,4,10,14b-Hexahidro-2-metildibenzo|c,f|pirizino  
|1,2-a|azepine hidroclorehidro.

P.M. 300.8, Fórmula química:  $C_{18}H_{20}N_2 \cdot HCl$ .

**Mecanismo de acción:** Antagonista inespecífico a receptores 5-HT,



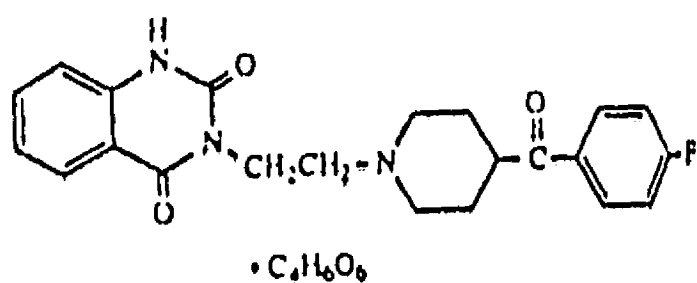
anteriormente se le atribuíó bloquear receptores 5-HT<sub>2</sub>. Se emplea como bloqueador a receptores 5-HT, en diferentes tareas conductuales. Por ser poco específico los resultados obtenidos en las pruebas no son confiables.

*Ketanserina: 3-[2-[4-(4-Fluorobenzoyl)-1-piperidinil]-2,4(1H,3H)-  
Quinazolin-2(1H)-one tartrato,*

*P.M. 545.5, Fórmula química: C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> · C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>.*

*Mecanismo de acción: Bloqueador específico a receptores 5-HT<sub>2</sub>,*

*Este fármaco tiene una gran cantidad de propiedades, se ha usado en clínica cardiovascular por sus efectos hipotensores tiene alta afinidad por los receptores 5-HT<sub>2</sub> periféricos, inhibe la vasoconstricción, broncoconstricción y la agregación plaquetaria. En investigaciones neurofisiológicas es ampliamente utilizado en diferentes estudios conductuales y bioquímicos como marcador selectivo al subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2</sub>.*



*En el tipo de experimentos efectuados en esta investigación, resultó de gran utilidad su empleo como se verá más adelante.*

### RESULTADOS DEL EXPERIMENTO III.

*Once animales fueron descartados, debido a que la situación de las cánulas para aquellos sujetos que fueron implantados, se encontraban asimétricas o fuera del área blanco; consecuentemente, el análisis estadístico se llevó a cabo con los datos obtenidos de 201\* ratas a las que se les ubicó en los grupos que recibieron mianserina y ketanserina en el estriado y en la corteza parietal. Las puntas de las cánulas de los grupos estriatales y las que quedaron en la corteza parietal se ilustran en la figura 10.*

\* Estos datos son con fines estadísticos, ya que se repiten 3 grupos.



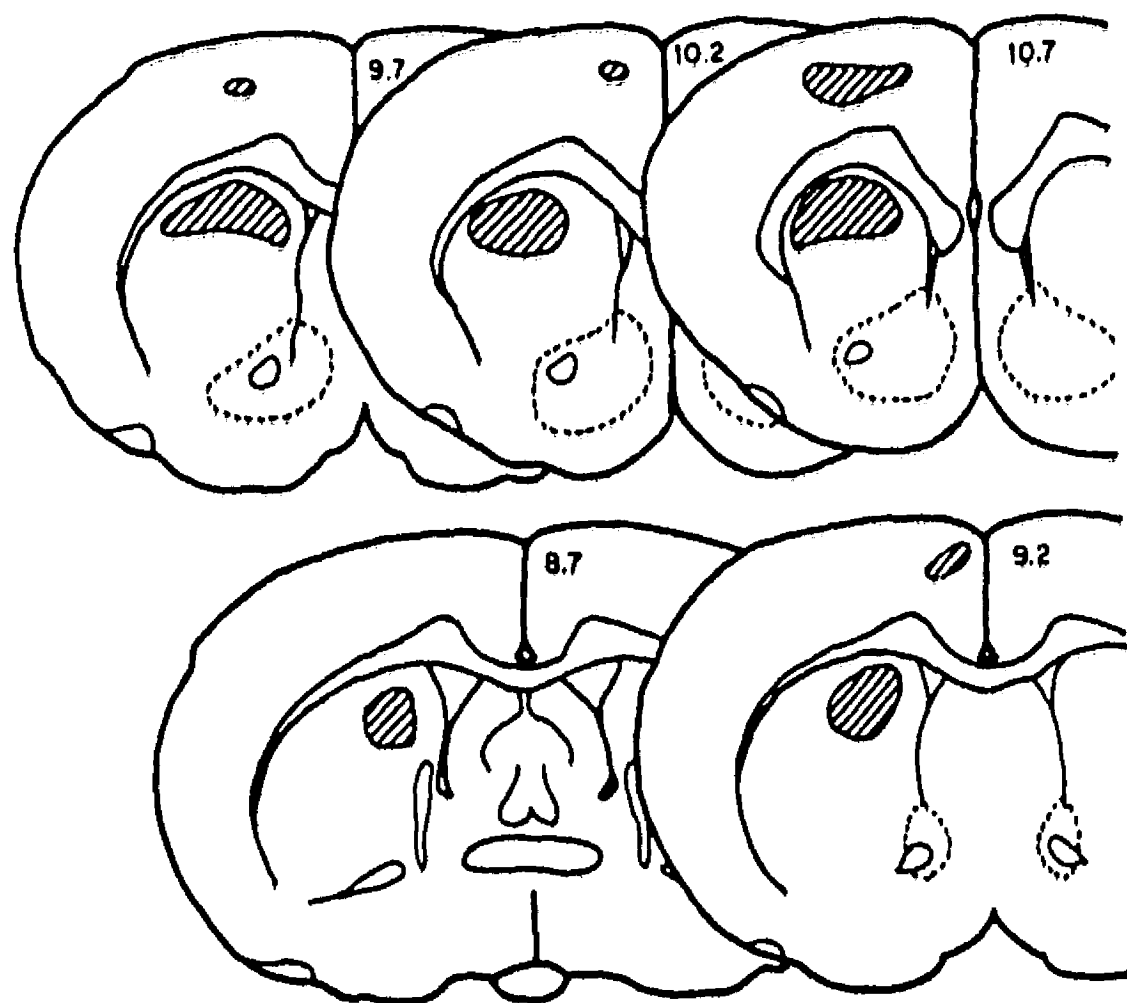


Figura 10

Representación diagramática de secciones histológicas, modificadas de Paxinos y Watson (1982). Las áreas sombreadas representan la extensión de la localización de las puntas de las cánulas en el estriado anterior y en la corteza parietal. Sólo se representan las cánulas situadas en el hemisferio derecho.

Para este tercer experimento, el análisis de varianza mostró que no había diferencias significativas entre los grupos relativos al entrenamiento y los tiempos de latencia de escape para los grupos inyectados intrastriatalmente y en la corteza parietal a los que se les aplicó ketanserina, mianserina o ambas drogas para el caso de los de la corteza parietal.

Para los grupos que fueron tratados con mianserina, la prueba de Kruskal-Wallis demostró que no había diferencias significativas en la retención entre los grupos ( $H = 10.689$ ,  $gl = 9$ ,  $P = NS$ ) (figura 11).

En la gráfica podemos observar que los promedios de latencias en la retención a diferentes dosis de mianserina aplicadas en el estriado anterodorsal no tuvieron efectos amnésicos claros, lo mismo ocu-

FALLA DE ORIGEN

...rió para la corteza parietal.

Para los grupos que fueron tratados con ketanserina, la prueba de Kruskal-Wallis demostró que había diferencias altamente significativas en la retención entre los grupos ( $H = 18.484$ ,  $gl = 8$ ,  $P = 0.017$ ).

En la figura 12, se muestra claramente respecto a los promedios de las latencias de retención, que una mínima dosis de ketanserina (0.004 ug/ul/min) produjo el mayor efecto amnésico, observamos también que se presenta una brusca respuesta entre las dosis de 0.004 a 0.0005 ug/ul de ketanserina en el estriado anterior. La combinación de ketanserina más mianserina en la corteza parietal no tuvo efectos amnésicos respecto a los controles.

En las siguientes páginas presentamos las respectivas gráficas de los resultados que hemos comentado.

## MIANSERINA

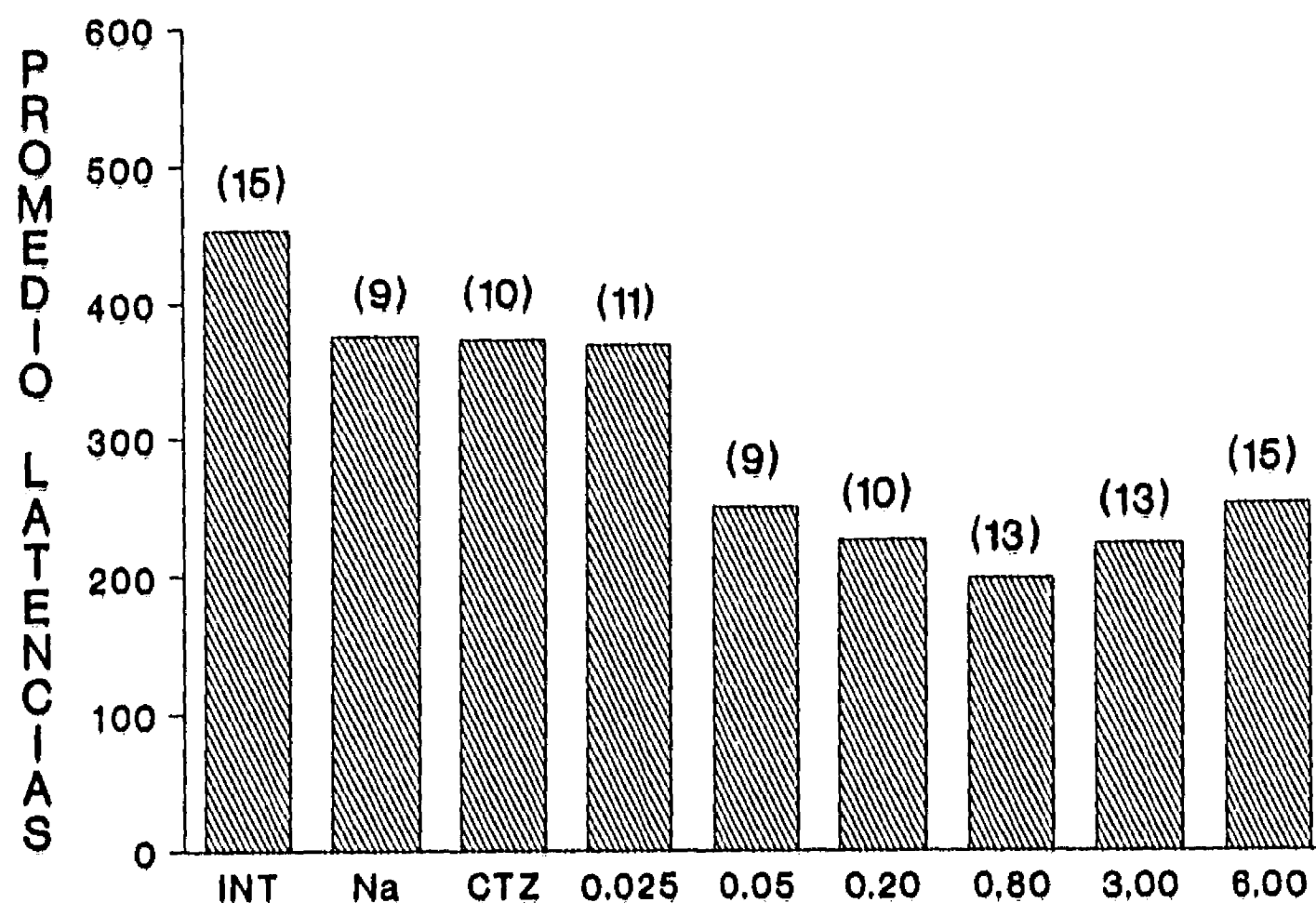


Figura 11

Promedio de las latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento. Las abreviaturas son las siguientes: INT, grupo íntegro; Na, animales a los que se les aplicó solución salina isotónica de un minuto y medio a dos minutos después del entrenamiento; CTZ, animales a los que se les aplicó 0.8 ug/ul de mianserina más 0.04 ug/ul de ketanserina en la corteza parietal de un minuto y medio a dos minutos después del entrenamiento en la corteza parietal; (0.025, 0.05, 0.20, 0.80, 3.0, 6.0) dosis en ug de mianserina de un minuto y medio a dos minutos después del entrenamiento; ( ), los números en el interior de cada paréntesis sobre las barras significa el número de sujetos por grupo. La intensidad del choque eléctrico fue de 4 mA.

## KETANSERINA

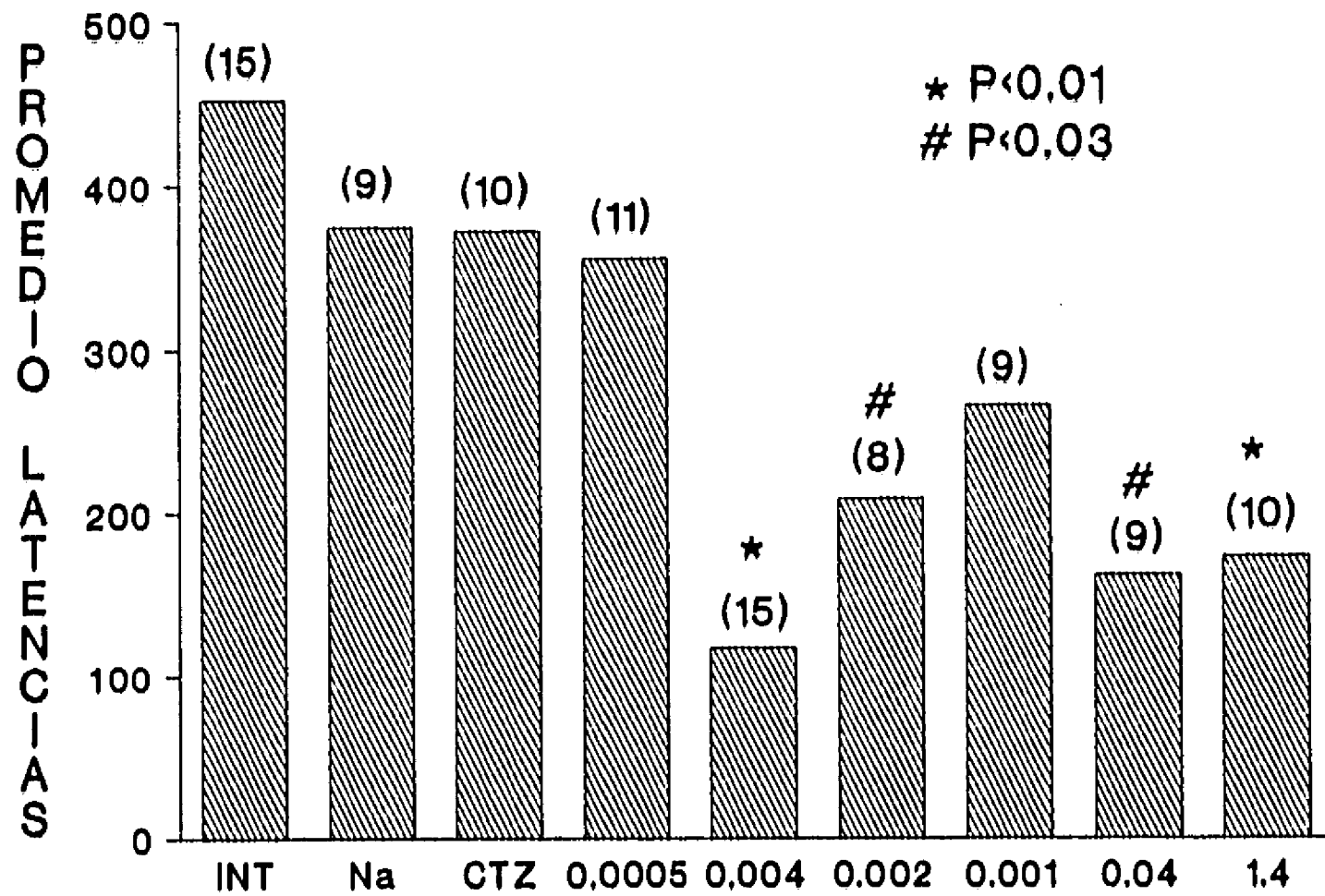


Figura 12

Promedio de las latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento. Las abreviaturas son las siguientes: INT, grupo íntegro; Na, animales a los que se les aplicó solución salina isotónica de un minuto y medio a dos minutos después del entrenamiento; CTZ, animales a los que se les aplicó 0.8 ug de mianserina más 0.04 ug de ketanserin por ul en la corteza parietal de un minuto y medio a dos minutos después del entrenamiento; (0.0005, 0.004, 0.002, 0.001, 0.04 y 1.4) dosis en ug de ketanserina aplicada de un minuto y medio a dos minutos después del entrenamiento; ( ), los números en el interior de cada paréntesis sobre las barras significa el número de sujetos por grupo. La intensidad del choque eléctrico fue de 4 mA.

### DISCUSION DEL EXPERIMENTO III

Este es el primer trabajo de investigación en donde se aplican bloqueadores de receptores 5-HT en el estriado; los reportes que existen se refieren a la administración i.p. de la mianserina o la ketanserina antes de la prueba de un hábito aversivo previamente aprendido (Altman y Normile, 1986) o a su aplicación i.p. después del entrenamiento en tareas de prevención pasiva (Altman y Normile, 1987) o en aquellos casos en los que su aplicación fue s.c. un minuto después del entrenamiento, asociados a tratamientos con inhibidores de la recaptura de la 5-HT, en situaciones de amnesia inducida (Strek y col., 1989). O por otra parte la aplicación de la ketanserina en el septum lateral (Lee y col., 1992). En todos estos casos mencionados se produjo una mejoría de la memoria.

Por otra parte ha resultado de gran interés el estudiar las respuestas mediadas por la serotonina utilizando diferentes dosis de ketanserina, para bloquear específicamente receptores 5-HT<sub>2</sub> y observar sus efectos sobre diferentes conductas (Ashby y col., 1990; Elson y col., 1988; Gudelsky y col., 1986; Johnson y Kitts, 1991; Mants y col., 1990; Meldenson y Gorzalka, 1986).

Como se señaló en su oportunidad, a través de estudios de localización y caracterización autorradiográfica se ha podido determinar que el estriado posee receptores 5-HT<sub>2</sub> (Leysen y col., 1984; Nakada y col., 1984; Altar y col., 1986; Wong y col., 1987; Waeber y col., 1988; Blin y col., 1990; O'dell y col., 1990; Saltzman y col., 1991; Tamir y col., 1991). Estas consideraciones vienen al caso en virtud, de que un objetivo importante en esta investigación, fue la determinar el papel que juegan dichos receptores en el estriado como se co

...mentará más adelante, hasta este estudio no se había ubicado la importancia de estos receptores estriatales en procesos cognitivos.

Para poder entender mejor este fenómeno, es necesario señalar que existen reportes en los que no puede precisarse exactamente el tipo de función que desempeñan los receptores 5-HT<sub>2</sub>; por ejemplo, Roth y col. (1987) caracterizaron dos sitios de reconocimiento a la [<sup>3</sup>H] ketanserina en el estriado de la rata; uno de alta afinidad similar al sitio 5-HT<sub>2</sub> previamente caracterizado, y otro de baja afinidad sin saber cual es su función. Asimismo, se han caracterizado sitios de unión no serotoninérgicos a la [<sup>3</sup>H] ketanserina en el estriado de la rata (Leysen y col., 1988; Dewar y col., 1990; Leysen y col., 1991). Hasta estas fechas no se sabe cual es la función de dichos receptores, pudiendo en algunos casos mediar las respuestas facilitadoras de la vía serotoninérgica, como antes se señaló, sin que existan pruebas contundentes al respecto.

En la sección correspondiente al sistema colinérgico estriatal se dieron suficientes evidencias del importante papel que éste juega en procesos de aprendizaje y memoria.

Por ejemplo, Maura y col. (1989) observaron un efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la liberación de [<sup>3</sup>H] ACh en cortes y sinaptosomas del hipocampo de rata (ver Maura y Raiteri, 1986). Estos datos y otros previamente señalados en otros estudios autorradiográficos, inmunológicos y neurofarmacológicos se ha determinado el papel relevante de la vía serotoninérgica en el estriado y su acción reguladora sobre la ACh.

En otros experimentos, se ha encontrado que el metitepin, un antagonista no selectivo a 5-HT<sub>1</sub>/5-HT<sub>2</sub> y que participa en la autorregulación de la vía serotoninérgica rafe-estriado, antagonizó el efecto inhibitorio de la 5-HT<sub>2</sub> sobre la liberación de [<sup>3</sup>H] ACh eléctricamente

estimulada, efecto que no lo realizó la ketanserina. Por otra parte el 1(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano, un agonista selectivo a 5-HT<sub>2</sub> no pudo imitar el efecto producido por la 5-HT, de tal modo que la interacción 5-HT/ACh pueda estar mediada por un receptor tipo 5-HT<sub>1</sub> (Maura y col., 1989).

Sin embargo estos resultados contrastan con los encontrados por Muramatsu y col. (1988) quienes observaron que la inhibición producida por la 5-HT en la liberación de [<sup>3</sup>H]ACh inducida por potasio en cortes de hipocampo de rata, fue prevenida por la aplicación de los antagonistas no selectivos a 5-HT<sub>2</sub> mianserina, metisergide y spiperone. Además, esta inhibición en la liberación de [<sup>3</sup>H]ACh producida por la 5-HT, no pudo ser imitada por el 8-OH-DPAT o prevenido por el antagonista a 5-HT<sub>3</sub> el metaclopramide o por el antagonista mixto a 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>1B</sub>, el propanolol (Howard y col., 1992).

Por otra parte, se cree que por las propiedades farmacológicas del receptor serotoninérgico en el hipocampo del puerco de guinea, el responsable para la inhibición de la ACh, se sugiere que es el receptor 5-HT<sub>1B</sub> quien actuó como mediador de este fenómeno (Fillion y col., 1991).

Estos resultados sumados a los que se han encontrado en cortes estriatales, en donde se ha observado que la 5-HT tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de ACh inducido por la oubaina (Haroutunian y col., 1985) o por el potasio (Gillet y col., 1985) También ha sido demostrado, confirmando la tesis de la gran importancia que juega tanto la vía serotoninérgica como la variedad de subtipos de receptores a 5-HT en el estriado, que para el caso de los resultados de nuestros experimentos, la atención se dirige al subtipo de receptor 5-HT<sub>2</sub>.

Más recientemente, Bianchi y col. (1989) reportaron que la 5-HT parece tener un efecto dual sobre la liberación basal de  $|3H|ACh$  en cortes estriatales en el puerco de guinea en donde se encontró:

a) un rápido y transitorio mejoramiento en la transmisión, posiblemente mediado por el receptor 5-HT<sub>2</sub> y,

b) seguido por una prolongada inhibición en la liberación, sensible a aquellos antagonistas a receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>. En este mismo estudio, se observó que el metisergide y el metitepin, previno completamente la inhibición inducida por 5-HT en la liberación de  $|3H|ACh$  eléctricamente estimulada, mientras que el propanolol y el antagonista a 5-HT<sub>2</sub>/5-HT<sub>1C</sub>, la ritanserina fueron inefectivos.

En otros experimentos se ha observado que la liberación de  $|3H|ACh$  en la corteza de la rata esta influenciada por la 5-HT (Barnes y col., 1989; Maramatsu y col., 1990; Bianchi y col., 1986; 1990; Siniscalchi y col., 1990).

En relación a todos estos descubrimientos y la gran cantidad de datos que han sido documentados, el lector si no es cuidadoso, podría confundirse en relación a la idea original de nuestra hipótesis de trabajo. Antes de entrar con mayor detalle a dicha hipótesis y los resultados obtenidos, cabe mencionar los distintos efectos de agonistas o antagonistas serotoninérgicos sobre la liberación de la  $|3H|ACh$  en el tejido de hipocampo, estriado y corteza, que pueden estar relacionados a las diferencias en cuanto a especies animales, mecanismos en relación a sitios receptores-específicos, así como al tipo de estimulación (KCl VS estimulación eléctrica) y la dosis del ligando empleado (Howard y col., 1992). Tomando en cuenta todos estos datos mencionados, podemos decir que en relación a los experimentos efectuados



en esta tesis doctoral que la serotonina es un neurotransmisor que en el sistema nervioso central, juega un importante papel regulando una gran diversidad de funciones que exceden los límites del sistema nervioso.

En nuestro caso, pudimos confirmar que la serotonina tiene una importante participación en procesos de aprendizaje y memoria, la administración de la PCA i.p., en tareas de prevención pasiva tuvo efectos amnésicos, hallazgo que previamente había sido comprobado por numerosas investigaciones que antes ya señalamos. En nuestros experimentos encontramos algo original en relación a la PCA; su administración directa en el estriado tuvo un efecto tiempo-dependiente produciendo un estado amnésico importante. Hasta este momento, podemos ya precisar la participación de la serotonina estriatal en procesos de retención en tareas de prevención pasiva, sin embargo, faltaba lo más importante y que es precisamente el tema central de nuestra investigación, cual es el tipo de receptor que participa en estas funciones; se encontró que:

- a) La aplicación intraestriatal de una dosis muy baja 0,004 ug/ul de ketanserina produce un estado amnésico importante en tareas de prevención pasiva (figura 12).
- b) Como ya se ha señalado y fundamentado ampliamente, la ketanserina es un bloqueador específico para receptores 5-HT<sub>2</sub>.
- c) La mianserina que es un bloqueador inespecífico a 5-HT, aplicado intraestriatalmente no produjo ningún efecto amnésico importante a diferentes dosis, lo que hace suponer que otros subtipos de receptores a 5-HT no tienen una participación importante en la retención de tareas de prevención pasiva en esta estructura estriatal (figura 11).

d) Otra aportación importante en esta investigación fue que la aplicación de la combinación de mianserina y ketanserina en la corteza parietal no tiene efectos amnésicos en estas tareas de prevención pasiva, con estos resultados podemos inferir que la corteza parietal no posee receptores a 5-HT<sub>2</sub> que pudieran participar en el aprendizaje y la memoria, a través de la vía serotoninérgica, en este sentido habría que hacer experimentos pertinentes que confirmen tal suposición.

Para concluir esta parte de la discusión, las evidencias conductuales que existen en relación a la interacción de la vía serotoninérgica y colinérgica, sugieren que ambos sistemas están involucrados en el aprendizaje y la memoria y que la integridad funcional de ambos puede estar comprometida en la enfermedad de Alzheimer (Gottfries, 1985; Hardy y col., 1985). Por ejemplo, la mayoría de estudios ha encontrado que el receptor 5-HT<sub>1</sub> muestra pocos cambios; mientras que los receptores 5-HT<sub>2</sub> frecuentemente muestran mayor decremento en la enfermedad de Alzheimer (Cross y col., 1986; Jansen y col., 1990).

La pérdida de receptores 5-HT en la enfermedad de Alzheimer puede deberse directamente a procesos de la enfermedad por sí mismos (Mann y Yates, 1983; Yamamoto y Hirano, 1985) o secundariamente al déficit colinérgico (Quirion y col., 1985; Wenk y Engisch, 1986).

Respecto a los cambios más tardíos de los receptores 5-HT, estos pueden resultar de la pérdida de neuronas colinérgicas o representar una respuesta homeostática normal en atención a mantener un balance

entre los sistemas colinérgico y serotoninérgico (Howard y col., 1992).

Estos últimos datos nos permiten hacer las siguientes consideraciones:

- a) En enfermedades en las que se han encontrado daños en la memoria como es el caso de la enfermedad de Alzheimer, los receptores que se ven afectados son principalmente 5-HT<sub>2</sub>, localizados, como se documentó en capítulos anteriores, principalmente en el estriado, hallazgo que corrobora nuestros descubrimientos.
- b) Independientemente de las aportaciones teóricas que en un futuro puedan establecerse a partir de descubrimientos formales, los datos que aportan los trastornos clínicos, son una aportación útil que confirma el trabajo experimental y que particularmente, me pareció importante señalarlo con los resultados arriba descritos.

#### CONCLUSIONES FINALES:

- 1.- La vía serotoninérgica juega un papel importante en el proceso de la consolidación de la memoria en una tarea de prevención pasiva de un sólo ensayo.
- 2.- La vía serotoninérgica posiblemente participe en forma bidireccional con la vía colinérgica en procesos de aprendizaje y memoria instrumentales.
- 3.- El estriado es una estructura anatómica y funcional indispensable en procesos cognitivos.
- 4.- La vía serotoninérgica posiblemente no participe en tareas sobrerreforzadas en prevención pasiva.
- 5.- Los receptores 5-HT<sub>2</sub> en el estriado antero-dorsal juegan un papel muy importante posiblemente regulando la función colinérgica.

..gica en procesos de memoria a corto y largo plazo en tareas de prevención pasiva.

- 6.- La respuesta obtenida con la mianserina en el estriado antero-dorsal, permite suponer la inexistencia de receptores diferentes a 5-HT<sub>2</sub> localizados específicamente en esa región, sin embargo estos datos son muy pobres para hacer tal suposición con toda claridad.

Para terminar, los últimos comentarios que hago respecto a esta investigación son los siguientes:

A) Mi naturaleza como médico y mis inquietudes de compromiso social, me han llevado a plantearme que posibilidades existen para poder concretar estos conocimientos experimentales en aplicaciones clínicas. Por tal motivo se me ocurre lo siguiente:

- 1.- Investigar la interacción en el estriado de la serotonina y la acetilcolina y como ésta es regulada.
- 2.- Establecer si existen en el estriado la participación de otros neurotransmisores con la interacción serotonina-acetilcolina y cuales son sus implicaciones funcionales en el aprendizaje y la memoria, primero en tareas instrumentales y luego clínicas.
- 3.- Para poder realizar la parte clínica, primero se tendría que probar si las lesiones en el estriado pueden ser revertidas a través de una serie de combinaciones farmacológicas de los neurotransmisores que en esa región se encuentren implicados; esta sería todavía una tarea experimental en ratas, si se llegará a probar lo antes dicho, muy a largo plazo, se iniciaría el estudio en aquellos pacientes con trastornos neurodegenerativos que ha perdido la memoria a corto plazo.

## CAPITULO VII

## R E F E R E N C I A S

- Abi-Dargham, A., Laruella, M., Wong, D.Y., Robertson, D.W., Weinberger, D.R. and Kleinman, J.E. 1993; Pharmacological and regional characterization of [<sup>3</sup>H]LY278584 binding sites in human brain, *J. Neurochem.*, 60 (2), pp 730-737.
- Aghajanian, G.K. and Freedman, D.X. 1968; Biochemical and morphological aspects of LSD. In: *Psychopharmacology; a review of progress* (D.H. Efron, ed), pp 1185-1193, U.S. Government Printing Office, Washington D.C.
- Aghajanian, G.K., Sprouse, J.S. and Rasmussen, K. 1987; Physiology of the midbrain serotonin system, In: *Psychopharmacology; The Third Generation of Progress*, Meltzer, H.Y. (ed), Raven, New York, pp 141-149.
- Ahlenius, S. and Larsson, K. 1985; Antagonism by lisuride and 8-OH-DPAT of 5-HTP-induced prolongation of the performance of male rat sexual behavioral, *Eur. J. Pharmacol.*, 110, pp 379-381.
- Ahlenius, S. and Larson, K. 1989; Antagonism by pindolol, but not betaxolol, of 8-OH-DPAT-induced facilitation of male rat sexual behavior, *J. Neural Transm.*, 77, pp 163-170.
- Ahlenius, S., Larsson, K., Svensson, L., Hjorth, S., Lindberg, P., Wikström, H., Sanchez, D., Arvidsson, L-E., Hacksell, U. and Nilsson, J.L. C. 1981; Effects of a new type of 5-HT receptor agonist on male rat sexual behavior, *J. Neural. Transm.*, 77, pp 163-170.
- Airaksinen, M.M. and McIsaac, W.M. 1968; Indolealkylamines and behavior. *Ann. Med. exp. Fenn.*, 46. pp 367-381.
- Altar, C.A., Boyar, W.C. and Marien, M.R. 1986; <sup>125</sup>I-LSD autoradiography confirms the preferential localization of caudate-putamen S2 receptors to the caudal (Peripallidal) region. *Brain Res.*, 372 (1), pp 130-136.
- Altman, H.J. 1983; Facilitation of retrieval by Pre-test administration of oxotremorine in mice. *Society for Neuroscience*, 9, p 827.

- Altman, H.J., 1985; Mediation of storage and retrieval with two drugs which selectively modulate serotonergic neurotransmission. In D.S. Olton, E. Gamzu and S. Corkin (Eds), Memory dysfunctions; An integration of animal and human research from preclinical and clinical perspectives, vol. 444, Annals of the New York Academy of Sciences (pp 496-498). New York; New York Academy of Sciences.
- Altman, H.J and Normile, H.J. 1987; Different temporal effects of serotonergic antagonists on passive avoidance retention. Pharmacol, Biochem, Behav. 28 (3), pp 353-359.
- Altman, H.J, and Normile, H.J. 1986; Enhancement of the memory of a previously learned aversive habit following pretest administration of a variety of serotonergic antagonists in mice. Psychopharmacology (Berl), 90 (1), pp 24-27.
- Altman, H.J. and Normile, H.J. 1988; What is the nature role of the serotonergic nervous system in learning and memory; prospects for development of an effective treatment strategy for senile dementia. Neurobiol. Aging (UNITED STATES), 9 (5-6), pp 627-638).
- Altman, H.J. and Quartermain, D. 1983; Facilitation of memory retrieval by centrally administered catecholamine stimulating agents. Behav. Brain Res., 7, pp 51-63.
- Altman, H.J., Nordy, D.A. and Ögren, S.O. 1984: Role of serotonin in memory: facilitation by alaproclate and zimeldine. Psychopharmacology, 84, pp 496-502.
- Altman, H.J., Ögren, S.O., Berman, R.F. and Normile, H.J. 1989: The effects of the P-chloroamphetamine, a depletor of brain serotonin the performance of rats two types of positively reinforced complex spatial discrimination task. Behav-Neural-Biol., 52, pp 131-144.
- Altman, H.J., Stone, W.S. and Ögren, S.O. 1984: Evidence for a possible functional interaction between serotonergic and cholinergic mechanism in memory retrieval. Behav. Neural Biol. (UNITED STATES), 48 (1), pp 49-62.
- Amin, A.H., Crawford, T.B.B. and Gaddum, J.H. 1954: The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. J. Physiol. (LONDON), 126, pp 596-618).
- Andén, N.E., Carlsson, A. and Häggendal, J. 1969: Adrenergic mechanisms, Ann. Rev. Pharmacol., 9, pp 119-133.
- Andén, N.E., Corrodi, H., Fuxe, K. and Hökfelt, T. 1968: Evidence for a

central 5-hydroxytryptamine receptor stimulation by lysergic acid diethylamide. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* 34, pp 1-7.

Andén, N.E., Dahlström, A., Fuxe, K., Larsson, K., Olsson, L. and Ungers-  
tedt, U. 1966; Ascending monoamine neurons to the telencephalon and dien-  
cephalon. *Acta Physiol Scand.* 67, pp 313-326.

Archer, T. 1982; Serotonin and fear retention in the rat. *Journal of Compa-  
rative and Physiological*, 96 (3), pp 491-516.

Archer, T., Ögren, S.O., Ross, S.B. and Magnusson, O. 1984; Retention defi-  
cits induced by acute P-chloroamphetamine following fear conditioning  
in the rat. *Psychopharmacology (Berl) (GERMANY, WEST)*, 82 (1-2), p 14-19.

Arvidsson, L.E. 1987; Medicinal chemistry of 8-OH-DPAT, In: *Brain 5-HT1A  
Receptors*, Dourish, C.T., Ahlenius, S., Hutson, P.H. (ed), Ellis Horwood,  
Chichester, pp 19-26.

Arvidsson, L.E., Hackell, U., Nilsson, J.L.G., Hjorth, S., Carlsson, A.,  
Lindberg, P., Sanchez, D. and Wikström, H. 1981; 8-Hydroxy-2-(di-n-pro-  
pil-amino)tetralin, a new centrally acting 5-Hydroxytryptamine receptor  
agonist. *J. Med. Chem.*, 24, pp 921-923.

Ashby, L.R., Jiang, L.H., Kasser, R.J. and Wang, R.Y. 1990; Electrophysiolo-  
gical characterization of 5-hydroxytryptamine-2 receptors in the rat me-  
dial prefrontal cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 252, pp 171-178.

Ashcroft, G.W., Crawford, T.B., Eccleston, D., Sharman, O.F., Mac Dougall,  
E.G., Stanton, J.B. and Binns, J.K. 1966; 5-Hydroxyindole compounds in  
the cerebrospinal fluid of patients with psychiatric or neurologic di-  
sease. *Lancet* ii: 1049.

Ashcroft, G.W., Eccleston, D. and Crawford, T.B. 1965; 5-Hydroxyindole me-  
tabolism in rat brain: a study of intermediate metabolism using the tec-  
hnique of tryptophan loading. *I.J. Neurochem.* 12, pp 483-492.

Azmitia, E. 1978; The serotonin producing neurons of the midbrain median  
and dorsal raphe nuclei. In L.L. Iverson, S.D. Iverson and S.H. Snyder  
(Eds), *Handbook of pharmacology* (pp, 233-304). New York: Plenum.

Azmitia, E.C., and Segal, M. 1978; An autoradiographic analysis of the di-  
fferential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei  
in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 179, pp 641-668.

- Azmitia, E.C, and Whitaker-Azmitia, P.M, 1991: Awakening the sleeping giant; anatomy and plasticity of the brain serotonergic system, Department of Biology, New York University, New York, J. Clin. Psychiatry, (USA), 52 suppl., pp 4-16.
- Bammer, G, 1982: Pharmacological investigations of neurotransmitter involved in passive avoidance responding; a review and some new results, Neurosc. Biobehav. Rev., 6, pp 247-296.
- Barnes, J.M., Barnes, N.M., Costall, B., Naylor, R.J, and Tyers, M.B, 1989: 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate inhibition of acetylcholine release in cortical tissue, Nature, 338, pp 762-763.
- Basbaum, A.I., Clanton, C.H, and Fields, H.L, 1978: Three bulboespinal pathways from the rostral medulla of the cat; An autoradiographic study of pain modulating systems, J. Comp. Neurol., 178, pp 209-224.
- Battaglia, G., Sharkey, J., Kuhar, M.J. and Souza, E.B, 1991: Neuroanatomic specificity and time course of alterations in rat brain serotonergic pathways induced by MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine): assessment using quantitative autoradiography. Synapse, 8 (4), pp 249-260.
- Battaglia, G., Yeh, S.Y., O'hearn, E., Molliver, M.E., Kuhar, M.J. and Souza, E.B, 1987: 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [<sup>3</sup>H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites. J. Pharmacol Exp. Ther., 242 +3=, pp 911-916.
- Beal, M.F. and Martin, J.B, 1985: Topographical dopamine and serotonin distribution and turnover in rat striatum. Brain Res., 358 (1-2), pp 10-15.
- Becquet, D, Faudon, M, and Hery, F, 1988: In vivo evidence for acetylcholine control of serotonin release in the cat caudate nucleus: influence of halothane anaesthesia. Neuroscience, 27 (3), pp 819-826.
- Becquet, D., Faudon, M. and Hery F, 1989: Effect of thalamic parafascicularis nucleus stimulation in regulation of serotonergic transmission in the cat caudate nucleus: involvement of autoreceptors in the dorsalis raphe nucleus. Neuroscience, 33 (2), pp 293-300.
- Becquet, D., Faudon, M. and Hery, F, 1990a: The role of serotonin release and autoreceptors in the dorsalis raphe nucleus in the control of serotonin release in the cat caudate nucleus. Neuroscience, 39 (3), pp 639-647.
- Becquet, D, D., Faudon, M. and Hery, F, 1990b: In vivo evidence for an inhibitory glutamatergic control of serotonin release in the cat caudate



- nucleus; involvement of GABA neurons, *Brain Res.*, 519 (1-2), pp 82-88,
- Bennett, J.L, and Aghajanian, G.K, 1974; d-LSD binding to brain homogenates; possible relationship to serotonin receptors, *Life Sci.*, 15 pp 1935-1944,
- Bennett, J.P, and Snyder, S.H, 1976; Serotonin and lysergic acid diethylamide binding to rat brain membranes; relationship to postsynaptic serotonin receptors, *Mol. Pharmacol.*, 12 pp 373-389,
- Berger, T.W., Kaul, S., Stricker, E.M, and Zigmond, M.J, 1985; Hyperinnervation of the striatum by dorsal raphe after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats, *Brain Res. (NETHERLANDS)*, 336 (2) pp 354-358.
- Berger, U.U., Grzanna, R, and Molliver, M.E, 1992; The neurotoxic effects of P-chloroamphetamine in rat brain are blocked by prior depletion of serotonin. *Brain Res.*, 578 (1-2) pp 177-185.
- Bermudez-Rattoni, F, and Prado-Alcalá, R.A, 1979; Cholinergic blockade of the caudate nucleus and autoshaping in rats. *Soc. Neurosc. Astro.*, 5 p 314.
- Bernheimer, M., Birkmeyer, W. and Hornykiewicz, D, 1961; Distribution of serotonin in the human brain and its behavior in patients with Parkinson's syndrome, *Klin Woch Schr.*, 39 pp 1056-1059.
- Bianchi, C., Siniscalchi, A. and Beani, L. 1986; The influence of 5-hydroxytryptamine on the release of acetylcholine from guinea-pig brain *ex vivo* and *in vitro*. *Neuropharmacol.* 25 pp 1043-1049.
- Bianchi, C., Siniscalchi, A. and Beani, L. 1989; The effect of 5-hydroxytryptamine on [<sup>3</sup>H]-acetylcholine release from guinea-pig striatal slices. *Br. J. Pharmacol.* 25 pp 1043-1049
- Bianchi, C, Siniscalchi, A. and Beani, L. 1990; 5-HT<sub>1A</sub> agonist increase and 5-HT<sub>3</sub> agonist decrease acetylcholine efflux from the cerebral cortex of freely-moving guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* 101 pp 448-452.
- Blaschko, H. and Levine, W.C. 1966; Metabolism of indolealkylamines, In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Eichler, O. Farah, A. (ed), Springer Verlag, Berlin, pp 212-244.
- Blin, J., Sette, G., Fiorell, M., Bletry, O., Elghozi, J.L., Crouzel, C. and Baron, J.C. 1990; A method for the *in vivo* investigation of the serotonergic 5-HT<sub>2</sub> receptors in the human cerebral cortex using positron emission tomography and 18F-labeled setoperone. *J. Neurochem.* 54

(5) pp 1744-1754.

- Bloom, F.E., 1985; Neurohumoral transmission and the central nervous system., In; The Pharmacological Basis of Therapeutics., Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F. (ed), Mac Millan, New York, pp 236-259.
- Blue, M.E., Yagaloff, K.A., Mamounas, L.A., Hartig, P.R. and Molliver, M.E. 1988; Correspondence between 5-HT<sub>2</sub> receptors and serotonergic axons in rat neocortex. Brain Res. 453 (1-2) pp 315-328.
- Bluth, R., Langnickel, R. and Ott, T. 1985; Modulation by dopaminergic and serotonergic systems of cholinergic interneurons in nucleus accumbens and striatum. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 37 (6) pp 753-763.
- Bogdanski, D.F., Pletscher, A., Brodie, B.B. and Udenfriend, S. 1956; Identification and assay of serotonin in brain. J. Pharmacol. Exp. Ther., 117 pp 82-88.
- Eooth, J.E., Van der Schoot, P. and Moleman, P. 1979; Parachlorophenylalanylne and copulatory behaviour in neonatally castrated male rats. Physiol. Behav., 23 pp 701-707.
- Eorst, A., Delacour, J. and Linbonban, S. 1970; Effects of lesions of caudate nucleus on conditioning of alternation respons in rats. Neuropsychol. , 8 pp 89-101.
- Bovento, G., Scatton, B., Claustre, Y. and Roquier, L. 1992; Effect of local injection of 8-OH-DPAT into the dorsal or median raphe nuclei on extracellular levels of serotonin in the serotonergic projection areas in the rat brain. Neurosci. Lett. 137 (1) pp 101-104.
- Bradley, P.B., Engel, G., Fenivk, W., Forzard, J.R., Humphery, P.P.A., Middlemiss, D.M., Mylecharane.E.J., Richardson, B.P. and Saxena, P.R. 1986; Proposal for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. Neuropharmacol., 25 pp 563-576.
- Brambilla, A., Ghiorzy, A., Pitsikas, N. and Borsini, F. 1993; DAU 6215, a novel 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, selectively antagonizes scopolamine-induced deficit in a passive-avoidance task, but not scopolamine-induced hypermotility in rats. J. Pharm. Pharmacol. 45 (9) pp 841-843.
- Broderick, P.A. 1985; In vivo electrochemical studies of rat striatal dopamine and serotonin release after morphine. Life Sci., 36 (24) pp 2269-2275.

- Brodie, T.G. 1900; The immediate action of an intravenous injection of blood serum, *J. Physiol.*, 26 pp 48-71.
- Brodie, B.B. and Shore, P.A. 1957; A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, New York.
- Brody, J.F. 1970; Behavioral effects of serotonin depletion and of P-chlorophenylalanine (a serotonin depletor) in rats. *Psychopharm.*, 17 pp 14-33.
- Burkard, W.P., Gey, K.F. and Pletcher, A. 1962; A new inhibitor of decarboxylase of aromatic amino acids. *Experientia*, 18 pp 411-412.
- Butcher, S.G. and Butcher, L.L. 1974; Origin and modulation of acetylcholine activity in the neostriatum. *Brain Res.*, 71 pp 167-171.
- Carli, M., Tatarczynska, E., Cervo, L. and Samanin, R. 1993; Stimulation of hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptors causes amnesia and anxiolytic-like but not antidepressant like effects in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 234 (2-3) pp 215-221.
- Carli, M., Tranchina, S. and Samanin, R. 1992; 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, impairs performance in a passive avoidance task. *Eur. J. Pharmacol.*, 211 (2) pp 227-234.
- Carlsson, A. 1964; Functional significance of drug-induced changes in brain monoamine levels, In: *Progress in Brain Research*, Himwich, H.E., Himwich, W.A. (ed), Elsevier, Amsterdam, pp 9-27.
- Carlsson, A. 1970; Effects of drugs on amine uptake mechanisms in the brain; *Bayer-Symposium II*, (ed), Springer Verlag, Heidelberg, pp 223-233.
- Carlsson, M. and Eriksson, E. 1986; A central serotonin receptor agonist, 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, has different effects on prolactin secretion in male and female rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 58 pp 297-302.
- Carlsson, A., Davis, J.N., Kehr, W., Lindquist, M. and Atack, C.V. 1972; Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 275 pp 153-158.

- Carlsson, A., Falck, E., Fuxe, K. and Hillarp, N.A., 1964; Cellular localization of monoamines in the spinal cord. *Acta Physiol. Scand.*, 60 pp 112-119.
- Cerrito, F. and Raiteri, M., 1979; Serotonin release is modulated by presynaptic autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 57 pp 427-430.
- Champney, T.H. and Matthews, R.T., 1991; Pineal serotonin is resistant to depletion by serotonergic neurotoxins in rats. *J. Pineal Res.*, 11 (3-4) pp 163-167.
- Chan-Palay, V., 1976; Serotonin axons in the supra and subependymal plexuses and in the leptomeninges: Their roles in local alterations of cerebrospinal fluid and vasomotor activity. *Brain Res.*, 102 pp 103-130.
- Caouloff, F., Laude, D. and Elghozi, J.L., 1989; Physical exercise; evidence for differential consequences of tryptophan on 5-HT synthesis and metabolism in central serotonergic cell bodies and terminals. *J. Neural Transm (AUSTRIA)* 78 (2) pp 121-130.
- Chen, H.Y., Lin, Y.P. and Lee, E.H., 1992; Cholinergic and GABAergic mediations of the effects of apomorphine on serotonin neurons. *Synapse* 10 (1) pp 34-43.
- Chinaglia, G., Landwehrmeyer, B., Probst, A. and Palacios, J.M., 1993; Serotonergic terminal transporters are differentially affected in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy; a autoradiographic study with [<sup>3</sup>H]citalopram. *Neuroscience* 54 (3) pp 691-699.
- Chugh, Y., Saha, N., Sankaranarayanan, A. and Sharma, P.L. and Datta, H., 1991a; Enhancement of memory retrieval and attenuation of scopolamine-induced amnesia following administration of 5-HT<sub>3</sub> antagonist ICS 205-930. *Pharmacol. Toxicol.* 69 (2) pp 105-106.
- Chugh, Y., Saha, N., Sankaranarayanan, A. and Sharma, P.L., 1991b; Memory enhancing effects of granisetron (BRL 43694) in a passive avoidance task. *Eur. J. Pharmacol.*, 203 (1) pp 121-123.
- Colino, A. and Halliwell, J.V., 1987; Differential modulation of the three separate K-conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. *Nature*, 328 pp 73-77.
- Contreras, C.M., Sanchez-Estrada, G., Molina-Hernandez, M. and Marvan, M.L., 1994; Electroconvulsive shock decreases excitatory responses to serotonin in the caudates nucleus of the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*, 18 (1) pp 193-199.

- Cooper, J.R., Bloom, F.E, and Roth, R.H, 1984; Las bases bioquímicas de la neurofarmacología. Edit. El manual moderno, S.A, de C.V, México, D.F,
- Costain, D.W, and Gree, A.R, 1978; beta-adrenoceptor antagonists inhibit the behavioural responses of rats to increased brain 5-hydroxytryptamine, Br. J. Pharmacol., 64 pp 193-200,
- Costall, B., Barnes, J.M., Hamon, M., Muller, W.E, and Briley, M, 1990; Biochemical models for cognition enhancers, Pharmacopsychiatry, 23 suppl 2 pp 85-88,
- Creese, I. and Snyder, S.H. 1978; [<sup>3</sup>H]-Spiroperidol labels serotonin receptors in rat cerebral cortex and hippocampus., Eur. J. Pharmacol., 49 pp 201-202.
- Crespi, F. 1986; Voltammetry in vivo with a single working electrode may permit detection of striatal dopamine-serotonin interactions in anesthetized and freely moving rats. Neurosci. Lett., 66 (1) pp 1-6.
- Crespi, F., Keane, P.E. and Morre, M. 1986; In vivo evaluation by differential pulse voltammetry of the effect of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on dopaminergic and serotonergic synaptic activity in the striatum and nucleus accumbens of the rat. Exp. Brain Res., 62 (2) pp 329-334.
- Cross, A.J., Crow, T.J., Ferrier, I.N. and Johnston, J.A. 1986; The selectivity of the reduction of serotonin S2 receptors in Alzheimer-type dementia. Neurobiol. Aging 7 pp 3-7.
- Cruz-Morales, S.E., Durán-Arévalo, M., Díaz del Guante, M.A., Quirarte, G, and Prado-Alcalá, R.A. 1992; A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. Behavioral and Neural Biology., 57 pp 256-259.
- Dahlström, A. and Fuxe, K. 1964; Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system., I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. Acta Physiol. Scand., 62 pp 1-55.
- Dahlström, A. and Fuxe, K. 1965; Evidence for the existence for monoamine neurons in the central nervous system., II. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels in bulbospinal neuron systems. Acta Physiol. Scand. (suppl 247) 64 pp 5-36.
- Decker, M.W. and McGaugh, J.L. 1991; The role of interactions between cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory., Synapse, 7 (2) pp 151-168.

- Demchyshyn, L., Sunahara, R.K., Miller, K., Teitler, M., Hoffman, B.J., Kennedy, J.L., Seeman, P., Van Tol, H.H. and Niznik, H.B. 1992; A human serotonin 1D receptor variant (5-HT1Dbeta) encoded by an intronless gene on chromosome 6, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89 (12) pp 5522-5526.
- DeMontigny, C. and Aghajanian, G.K. 1977; Preferential action of 5-methoxy tryptamine on presynaptic serotonin receptors; a comparative iontophoretic study with LSD and serotonin, Neuropharmacol., 16 pp 811-818.
- Dent, G.W., Rule, B.L., Tam, S.W. and De Souza, E.B. 1993; Effects of the memory enhancer linopirdine (DUP 996) on cerebral glucose metabolism in naive and hypoxia-exposed rats. Brain Res., 620 (1) p 7-15.
- Descarries, L., Soghomonian, J.J., Garcia, S., Doucet, G. and Bruno, J.P. 1992; Ultrastructural analysis of the serotonin hyperinnervation in adult rat neostriatum following neonatal dopamine denervation with 6-hydroxydopamine. Brain Res., 569 (1) pp 1-13.
- De Simoni, M.G., Dal Toso, G., Fodritto, F., Sokola, A. and Algeri, S. 1987; Modulation of striatal dopamine metabolism by the activity of dorsal raphe serotonergic afferences. Brain Res., 411 (1) pp 81-88.
- Deutsch, J.A. 1973; The cholinergic synapse and the site of memory. In: Deutsch, J.A. (ed) The Physiological Basis of Memory., Academic Press, New York pp 59-76.
- Dewar, K.M., Grodin, L., Carli, M., Lima, L. and Reader, T.A. 1992; [<sup>3</sup>H]Paroxetine binding and serotonin content of rat cortical areas, hippocampus, neostriatum, ventral mesencephalic tegmentum, and midbrain raphe nuclei region following P-chlorophenylalanine and P-chloroamphetamine treatment., J. Neurochem., 58 (1) pp 250-257.
- Dewar, K.M., Lima, L. and Reader, T.A. 1990; [<sup>3</sup>H]Ketanserin binds to non-5-HT<sub>2</sub> sites in rabbit cerebral cortex and neostriatum. Neurochem. Res., 15 (5) pp 507-514.
- Díaz del Guante, M.A., Cruz-Morales, S.E. and Prado-Alcalá, R.A. 1991; Time-dependent effects of cholinergic blockade of the striatum on memory, Neuroscience Letters, 122 pp 79-82.
- Díaz del Guante, M.A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G. and Prado-Alcalá, R.A. 1990; Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. Bol. Est. Med. Biol., Méx., 38 pp 49-53.

- Díaz, J.L., 1985; Modelos de esquizofrenia y serotonina cerebral, UNAM, México, D.F.
- Díaz, P.M., Ngai, S.H. and Costa, E., 1968; Factors modulating brain serotonin turnover., *Advan. Pharmacol.*, 6B pp 75-91.
- Dismukes, R.K. and Rake, A.V., 1972; Involvement of biogenic amines in memory formation, *Psychopharmacologia*, 23 pp 17-25.
- Dourish, C.T., Hutson, P.H. and Curzon, G., 1985; Characteristics of feeding induced by the serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT), *Brain Res. Bull.*, 15 pp 377-384.
- Drachman, D.A., 1977; Memory and cognitive function in man: Does the cholinergic system have a specific role?, *Journal of Comparative Neurology.*, 27 pp 783-790.
- Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, ., Cory, R. and Bockaert, J., 1988: A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system, *Mol. Pharmacol.*, 34 pp 880-887.
- Dunn, A.J., 1980; Neurochemistry of learning and memory: An evaluation of recent data., *Annual Review of Psychology.*, 31 pp 343-390.
- Duran-Arévalo, M., Cruz-Morales, S.E. and Prado-Alcalá, R.A., 1990: Is acetylcholine involved in memory consolidation of the over-reinforced learning?, *Brain Research Bulletin* 24 pp 725-727.
- Elson, A.G., Yocca, F.D. and Gianutsos, G., 1988: Noradrenergic denervation alters serotonergic-mediated behavior but not serotonergic receptor number in rats: modulatory role of beta adrenergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246 pp 571-577.
- Engel, J.A., Hjorth, S., Svensson, K., Carlsson, A. and Liljequist, S., 1984: Anticonflict effect of the putative serotonin receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT)., *Eur. J. Pharmacol.*, 105 pp 365-368.
- Essman, W.B., 1974: Brain 5-hydroxytryptamine and memory consolidation. In: E. Costa, G.L. Gessa and M. Sandler (eds), *Advances in biochemical Psychopharmacology: Vol. 11. Serotonin- New Vistas; biochemistry and clinical studies.* New York: Raven Press.

- Essman, W.B. 1973; Neuromolecular modulation of experimentally-induced retrograde amnesia, *Confin. Neurol.*, 35 pp 1-22.
- Essman, W.B. 1978; Serotonin in learning and memory, In; W.B. Essman (Ed), *Serotonin in health and disease; Vol. 3, The central nervous system*, New York: Spectrum Publications,
- Euvard, D., Javoy, F., Hebert, A. and Glowinski, J. 1977; Effect of quipazine, a serotonin-like drug, on striatal cholinergic interneurons, *European Journal of Pharmacology.*, 41 pp 281-289.
- Falck, B, Hillarp, N., Thieme, G. and Thorp, A. 1962; Fluorescence of catecholamines and related compounds with formaldehyde, *J. Histochem. Cytochem.*, 10 pp 348-354.
- Farrow, J.T. and Van Vanukis, H. 1972; Binding of d-lysergic acid diethylamide to subcellular fractions from rats brain, *Nature*, 237 pp 164-166.
- Fernández, S.M., Solodkin, M.H. and Prado-Alcalá, R.A. 1977; Blockade and activation of caudate cholinergic activity. Effects on passive avoidance. *Neuroscience Abstracts.*, 3 p 232.
- Feurstein, T.J., Lupp, A. and Hertting, G. 1992; Quantitative evaluation of the autoinhibitory feedback of release of 5-HT in the caudate nucleus of the rabbit where an endogenous tone on alpha 2 adrenoceptors does not exist. *Neuropharmacology*, 31 (1) pp 15-23.
- Fibiger, H.C., Lepiane, F.B. and Phillips, A.G. 1978; Disruption of memory produced by stimulation of the dorsal raphe nucleus: Mediation by serotonin. *Brain Res.*, 155 pp 380-386.
- Fillion, G., Barone, P., Cloez, I., Fillion, M-P., Harel, C., Massot, O., Rousselle, J-C and Zifa, E.A. 1991; A cerebral endogenous factor regulates the activity of the serotonergic receptors modulating the neuronal release of acetyl choline. In: Kito, S., (ed). *Neuroreceptor mechanisms in brain*. New York: Plenum., pp 165-176.
- Fillion, G., Fillion, M-P., Spirakis, C., Bahers, J-M. and Jacob, J. 1976; 5-Hydroxytryptamine binding to synaptic membranes from rat brain. *Life Sci.*, 18 pp 65-74.
- Fletcher, P.J. 1991; Dopamine receptors blockade in nucleus accumbens or caudate nucleus differentially affects feeding induced by 8-OH-DPAT injected into dorsal or median raphe. *Brain Res.*, 552 (2) pp 181-189.



- Flood, J.F. and Cherkin, A. 1987; Fluoxetine enhances memory processing in mice. *Psychopharmacology (Berl) (GERMANY, WEST)*, 92 (1) pp 36-43.
- Flood, J.F., Smith, G.E. and Cherkin, A. 1985; Memory enhancement: Supra-additive effect of subcutaneous cholinergic drugs combinations in mice. *Psychopharmacology*, 86 pp 61-67.
- Fowler, C. and Ross, S.B. 1984; Selective inhibitors of monoamine oxidase A and B; biochemical, pharmacological and clinical properties. *Med. Res.*, 4 pp 323-358.
- Fuller, R.W. 1992; Effects of P-chloroamphetamine on brain serotonin neurons. *Neurochem.*, 17 (5) pp 449-456.
- Fuller, R.W. and Molloy, B.B. 1974; Recent studies with 4-chloroamphetamine and some analogues. In *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. E. Costa, G.L. Gessa y M. Sandler, Eds. Vol. 10; pp 195-205. The Raven Press New York, N.Y.
- Fuller, R.W. and Snoddy, H.D. 1993; Drug concentrations in mouse brain at pharmacologically active doses of fluoxetine enantiomers. *Biochem. Pharmacol.*, 45 (11) pp 2355-2358.
- Fuller, R.W., Snoddy, H.D. and Molloy, B.B. 1986; Central serotonin agonist actions of LY 165163, 1-(m-trifluoromethylphenyl)-4-(p-aminophenylethyl)piperazine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239 (2) pp 454-459.
- Fuller, R.W., Perry, K.W. and Moloy, B.B. 1975; Reversible and irreversible phases of serotonin depletion by 4-chloroamphetamine. *Eur. Journal of Pharmacol.*, 33 pp 119-124.
- Fuller, R.W., Snoddy, H.D., Krushinski, J.H. and Robertson, D.W. 1992; Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. *Neuropharmacology*. 31 (10) pp 997-1000.
- Fuller, R.W., Perry, K.W. and Ward, J.S. 1989; Decreased 5-hydroxytryptamine turnover in striatum and other brain regions after administration of 5-methoxy-3-(di-n-propylamino)chroman to rats. *J. Pharm Pharmacol.*, 41 (11) pp 805-806.
- Fuxe, K. and Jonsson, G. 1974; Further mapping of central 5-hydroxytrypta-

...mine neurons: Studies with the neurotoxic dihydroxytryptamines. In: Advances in Biochemical Psychopharmacology, Vol. 10, Serotonin -New Vistas (ed. E. Costa, G.L. Gessa and M. Sandler), pp 1-12, Raven Press, New York.

Fuxe, K., Hökfelt, T., Olson, L. and Ungerstedt, W. 1977: Central monoaminergic pathways with emphasis on their relation to the so called "extra pyramidal motor system". Pharmacol. Ther., 3 pp 169-210.

Gaddum, J.H. 1953: Antagonism between lysergic acid diethylamide and 5-hydroxytryptamine. J. Physiol., 121 pp 158.

Gaddum, J.H. and Picarelli, Z.P. 1957: Two kinds of tryptamine receptor. Brit. J. Pharmacol., 12 pp 323-328.

Galzin, A.M., Moret, C., Verzier, B. and Langer, S. Z. 1985: Interaction between tricyclic and nontricyclic 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors and the presynaptic 5-hydroxytryptamine inhibitory autorreceptors in the rat hypothalamus. J. Pharmacol. Exp. Therp., 235 pp 200-211.

Garattini, S. and Valzelli, L. 1965: Serotonin. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.

Gessa, G.L. and Tagliamonte, A. 1974: Possible role of free serum tryptophan in the control of brain tryptophan level and serotonin synthesis. In: Serotonin New Vistas (Costa, E., Gessa, G.L. and Sandler, M. eds), pp 119-133, New York.

Gerber, R., Barbaz, B.J., Martin, L.L., Neale, R., Williams, M. and Lieberman, J.M. 1985: Antagonism of L-5-hydroxytryptophan-induced head twitching in rats by lisuride: a mixed 5-hydroxytryptamine agonist-antagonist. Neurosc. Lett., 60 pp 207-213.

Geyer, M.A. and Lee, E.H. 1984: Effects of clonidine, piperoxane and locus coeruleus lesion on the serotonergic and dopaminergic systems in raphe and caudate nucleus. Biochem. Pharmacol. 33 (21) pp 3399-3404.

Gillet, G., Ammor, S. and Fillon, G. 1985: Serotonin inhibits acetylcholine release from rat striatum slices: evidence for a presynaptic receptor-mediated effect. J. Neurochem., 45 (6) pp 1687-1691.

Giordano, M. and Prado-Alcalá, R.A. 1986: Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. Pharmacology, Biochemistry and Behavior., 24 pp 905-909.

- Giovannini, M.G., Spignoli, G., Carla, U, and Pepeu, G, 1991; A decrease in brain catecholamines prevents oxiracetam antagonism of the effect of scopolamine on memory and brain acetylcholine, *Pharmacol, Res*, 24 (4) pp 395-405.
- Glick, S.D, and Greenstein, S, 1973; Comparative learning and memory deficits following hippocampal and caudate lesions in mice, *J. Comp, Physiol Psychol*, 82 pp 188-194.
- Glick, S.D., Marsanico, R.G, and Greenstein, S, 1974; Differecovery of function following caudate, hippocampal and septal lesions in mice, *J. Comp. Physiol, Psychol*, 86 pp 787-792.
- Gonzalez-Hedrich, J, and Peroutka, 1991; Postsynaptic localization of 5-HT<sub>1D</sub> receptor binding sites in human caudate, *Exp. Neurol.*, 113 (1) pp 28-30.
- Goodman, F.R, and Weiss, G.B. 1973; Alteration of 5-hydroxytryptamine-14C efflux by nicotine in rat brain area slices, *Neuropharmacology*, 12 pp 955-965.
- Goodwin, G.M, and Green, A.R, 1985; A behavioral and biochemical study in mice and rats of putative agonist and antagonist for 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 84 pp 743-753.
- Gottfries, C.G, 1985; Alzheimer's disease and senile dementias biochemical characteristics and aspects of treatment. *Psychopharmacol*. 86 pp 245-252.
- Gough, B., Ali, S.F., Slikker, W, Jr, and Holson, R.R. 1991; Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol. Biochem. Behavio*. 39 (3) pp 619-623.
- Gozlan, H., El Mestikawy, S., Pichat, L., Glowinski, J, and Hamon, M. 1983; Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: [<sup>3</sup>H]-PAT, *Nature*, 305 pp 140-142.
- Grahame-Smith, D. G. 1971; Studies in vitro on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptophan. *J. Neurochem.*, 18 pp 1053-1066.
- Grahame-Smith, D.G. 1964; Tryptophan hydroxylation in brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16 pp 586-592.
- Green, J.P. 1989; Histamine and serotonin, In: *Basic Neurochemistry*, Siegel, G.L. Agranoff, B.W., Albers, R.W., Molinoff, P.B. (ed), Raven Press

New York, pp 253-269.

Green, A.R., and Goodwin, G.M., 1987; The pharmacology of the hypothermic response of rodents to 8-OH-DPAT administration and the effects of psychotropic drug administration on this response, In: Brain 5-HT<sub>1A</sub> Receptors, Dourish, C.T., Ahlenius, S., Hutson, P. (ed), Ellis, Horwood, Chichester, pp 161-176.

Green, A.R., Grahame-Smith, D.G., 1976; (-)Propranolol inhibits the behavioural responses of rats to increased 5-hydroxytryptamine in the central nervous system, *Nature*, 262 pp 594-596.

Gudelsky, G.A., Koenig, J.I. and Meltzer, H.Y., 1986; Thermoregulatory responses to serotonin (5-HT) receptor stimulation in the rat: evidence for opposing roles of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Neuropharmacol.*, 25 pp 1307-1313.

Haber, S.N., 1986; Neurotransmitters in the human and nonhuman primate basal ganglia. *Human Neurobiol.*, 5 pp 159-168.

Haber, S.N. and Nauta, W.J.H., 1983; Ramifications of the globus pallidus in the rat as indicated by patterns of immunohistochemistry. *Neuroscience* 9 pp 245-260.

Haber, S.N., Groenewegen, H.J., Grove, E.A. and Nauta, W.J.H., 1985; Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato-pallidofugal pathway. *J. Comp. Neurol.*, 235 pp 322-335.

Haigler, H.J. and Aghajanian, G.K., 1974; Peripheral serotonin antagonists: Failure to antagonize serotonin in brain areas receiving a prominent serotonergic input. *J. Neural Transm.*, 35 pp 257-273.

Hall, M.D., El Mestikawy, S., Emerit, M.B., Pichat, L., Hamon, M. and Gozlan, H., 1985; [<sup>3</sup>H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding to pre and post-synaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. *J. Neurochem.*, 44 pp 1685-1696.

Hall, M.D., Gozlan, H., Emerit, M.B., el Mestkawy, S., Pichat, L. and Hamon, M., 1986; Differentiation of pre and post-synaptic high affinity serotonin receptor binding sites using physico-chemical parameters and modifying agents. *Neurochem. Res.* 11 (6) pp 891-912.

Hamlin, K.E. and Fisher, F.E., 1951; The synthesis of 5-hydroxytryptamine. *J. Am. Chem. Soc.*, 73 pp 5007-5008.

- Hamon, M., Fattaccini, C-M., Adrien, J., Gallissot, M-C., Martin, P. and Gozlan, H, 1988; Alterations of central serotonin and dopamine turnover in rats treated with ipsapirone and other 5-hydroxytryptamine 1A agonists with potential anxiolytic properties, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 246 pp 745-752.
- Hamon, M., Emerit, M.B., El Mestikawys, S, Vergé, D., Daval, G., Marquet, A, and Gozlan, H, 1987; Pharmacological, biochemical and functional properties of 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding sites labelled by [<sup>3</sup>H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the rat brain, In: *Brain 5-HT<sub>1A</sub> Receptors*, Dou<sup>u</sup>rish, C.T., Ahlenius, S, and Hutson, P.H, (ed), Ellis Horwood, Chichester., pp 34-51.
- Hardy, J., Adolfsson, R., Alafuzoff, I., Bucht, G., Marcusson, J., Nyberg, P., Per Dahl, E., Webster, P, and Winblad, B, 1985; Transmitter deficits in Alzheimer disease, *Neurochem Int.*, 7 pp 545-563.
- Haroutunian, V., Kanof, P, and Davis, K.L, 1985; Pharmacological alleviation of cholinergic lesions induced memory deficits in rats, *Life Sci.*, 37 pp 945-952.
- Hartig, P.R., Scheffel, V., Frost, J.J. and Wagner, H.N, Jr, 1985; In vivo binding of <sup>125</sup>I-LSD to serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors in mouse brain, *Life Sci (ENGLAND)*, 37 (7) pp 657-664.
- Harvey, J.A, 1978; Neurotoxic action of halogenated amphetamines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 305 pp 289-304.
- Harvey, J.A., McMaster, S.E. 1976; Neurotoxic actions of para-chloroamphetamine in the rat as revealed by Nissl and Silver stains. *Psychopharmacol. Bull*; 12 (3) pp 62-64.
- Harvey, J., Altman, H.J. and Normile, H.J, 1986; Enhancement of the memory of a previously learned aversive habit following pre-test administration of a variety of serotonergic antagonists in mice. *Psychopharmacology.*, 90 pp 24-27.
- Harvey, J., Altman, H.J., Williams, S.S. and Ögren, S.O. 1987; Evidence for a Possible Functional Interaction between Serotonergic and Cholinergic Mechanisms in Memory Retrieval Behavioral and Neural Biology, 48 pp 49-62.
- Harvey, J.A., McMaster, S.J. and Fuller, R.W. 1977; Comparison between the neurotoxic and serotonin depleting effects of various halogenated derivatives of amphetamine in the rat. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics.*, 202 pp 581-589.

- Harvey, J.A., McMaster, S.E. and Yunger, L.M. 1975; P-chloroamphetamine; Se active neurotoxic action in brain, *Science*, 187 pp 841-843.
- Haubrich, D.T. and Reid, W.D. 1972; Effects of pilocarpine or arecoline administration on acetylcholine levels and serotonin turnover in rat brain, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 181 pp 19-26.
- Haycock, J.W., Deadwyler, S.A., Sideroff, S.I. and McGaugh, J.L. 1973; Retrograde amnesia and cholinergic systems in the caudate-putamen complex and dorsal hippocampus of the rat, *Experimental Neurology*, 41 pp 201-213.
- Heimer, L., Switzer, R.D. and Van Hoesen, G.W. 1982; Ventral striatum and ventral pallidum. Components of the motor system?. *Trends Neurosci.*, 5 pp 83-87.
- Henderson, M.G., Perry, K.W. and Fuller, R.W. 1993; Possible involvement of dopamine in the long-term serotonin depletion by P-chloroamphetamine and beta, beta-difluoro-p-chloroamphetamine in rats, *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 267 (1) pp 417-424.
- Herrick-Davis, and Titeler, M. 1988; Detection and characterization of the serotonin 5-HT<sub>1D</sub> receptor in rat and human brain, *J. Neurochem.*, 50 (5) pp 1624-1631.
- Heuring, R.E. and Peroutka, S.J. 1987; Characterization of a novel [<sup>3</sup>H] 5-hydroxytryptamine binding site subtype in bovine brain membranes, *J. Neurosci.*, 7 pp 894-903.
- Heuring, R.E., Schlegel, J.R. and Peroutka, S.J. 1986; Species variations in RU 24969 interactions with non-5-HT<sub>1A</sub> binding sites, *Eur. J. Pharmacol.*, 122 pp 279-282.
- Hillegaart, V. 1991; Functional topography of brain serotonergic pathways in the rat, *Act. Physiol. Scand.* 142 suppl., 598 pp 1-54.
- Hjorth, S. 1985; Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT, *J. Neural Transm.* 60 pp 131-135.
- Hjorth, S. and Magnusson, T. 1988; The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in the rat brain in vivo, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 338 pp 463-471.
- Hjorth, S., Carlsson, A., Lindberg, P., Sanchez, D., Wikström, H., Arvidsson L-E., Hacksell, U. and Nilsson, J.L.G. 1982; 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, 8-OH-DPAT, a potent and selective simplified ergot conge-

...ner with central 5-HT-receptor stimulating activity, J. Neural Transm., 55 pp 169-188.

Hjorth, S., Carlsson, A., Magnusson, T. and Arvidsson, L.E., 1987; In vivo biochemical characterization of 8-OH-DPAT; Evidence for 5-HT receptor selectivity and agonist action in the rat CNS, In: Brain 5-HT<sub>1A</sub> Receptors, Dourish, Ahlenius, S., Hutson, P. (ed), Ellis Horwood, Chichester, pp 94-105

Ho, B.T., Schoolar, J.C. and Usdin, E., 1982; Serotonin in Biological Psychiatry, Adv. Biochem. Psychopharmacol., 34 New York, Raven.

Hole, K., Fuxe, K. and Jonsson, G., 1976; Behavioral effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesions of ascending 5-hydroxytryptamine pathways. Brain Res., 107 pp 385-399.

Howard, J., Normile, H.J. and Altman, H.J., 1992; Effects of Combined Acetylcholinesterase Inhibition and Serotonergic Receptor Blockade on Age-Associated Memory Impairments in Rats. Neurobiology of Aging., 13 pp 735-740.

Hoyer, D., Engel, G. and Kalkman, H.O., 1985a: Characterization of the 5-HT<sub>1B</sub> recognition site in rat brain: binding studies with (-)-[<sup>125</sup>I]iodocyanopindolol. Eur. J. Pharmacology., 118 pp 1-12.

Hoyer, D., Engel, G. and Kalkman, H.O., 1985b: Molecular Pharmacology of 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> recognition sites in rat and pig brain membranes: radioligand binding studies with [<sup>3</sup>H]5-HT, [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT, (-)-[<sup>125</sup>I]iodocyanopindolol, [<sup>3</sup>H]mesulergine and [<sup>3</sup>H]ketanserin. Eur. J. Pharmacol., 118 pp 13-23.

Hoyer, D., Pazos, A. and Palacios, J.M., 1986a: Serotonin receptors in the human brain. II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> recognition sites. Brain Res., 376 pp 97-107.

Hoyer, D., Pazos, A., Probst, A., Palacios, J.M., 1986b: Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT<sub>1A</sub> recognition sites. Apparent absence of 5-HT<sub>1B</sub> recognition sites Brain Res., 376 pp 85-96.

Hoyer, D., Waeber, C., Pazos, A., Probst, A. and Palacios, J.M., 1988: Identification of a 5-HT<sub>1</sub> recognition site in human brain membranes different from 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> sites. Neurosci. Lett., 85 (3) pp 357-362.

Huang, X. and Nichols, D.E., 1993: 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated potentiation of dopamine synthesis and central serotonergic deficits. Eur. J. Pharmacol., 238 (2-3) pp 291-296.

- Hutson, P.H., Dourish, C.T. and Curzon, G. 1988; Evidence that the hyperphagic response to 8-OH-DPAT is mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 15 pp 361-366.
- Hutson, P.H., Sarna, G.S., O'Connell, M.T. and Curzon, G. 1989; Hippocampal 5-HT synthesis and release in vivo is decreased by infusion of 8-OH-DPAT into the nucleus raphe dorsalis. *Neurosci. Lett.*, 100 pp 276-280.
- Invernizzi, R., Carli, M.D., Clemente, A. and Samanin, R. 1991; Administration of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain; differences in potency and regional sensitivity. *J. Neurochem.*, 56 pp 243-247.
- Iversen, L.L. 1970; Neuronal uptake processes for amines and amino acids. In: *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, Costa, E., Giacobini, E. (ed)., Raven Press, New York pp 109-132.
- Jackson, D., Bruno, J.P., Stachowiak, M.K. and Zigmond, M.J. 1988a; Inhibition of striatal acetylcholine release by serotonin and dopamine after the intracerebral administration of 6-hydroxydopamine to neonatal rats. *Brain Res.*, 457 (2) pp 267-273.
- Jackson, D., Stachowiak, M.K., Bruno, J.P. and Zigmond, M.J. 1988b; Inhibition of striatal acetylcholine release by endogenous serotonin. *Brain Res.*, 457 (2) pp 259-266.
- Jansen, K. L.R., Faull, R.L.M., Dragunow, M. and Synek, P. 1990; Alzheimer's disease: Changes in hippocampal N-methyl-D-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors -an autoradiographic study. *Neuroscience*, 39 pp 613-627.
- Jéquier, E., Lovenberg, W. and Sjordsma, A. 1967; Tryptophan hydroxylase inhibition: the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin. *Mol. Pharmacol.*, 3 pp 274-278.
- John, E.R. 1977; *Mecanismos de la memoria*. Editorial Trillas, S.A. México.
- Johnson, J.H. and Kitts, C.S. 1991; Analysis of neurotransmitter receptors mediating changes in LH release induced by electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Neurosci. Res.*, 29 pp 520-526.
- Johnson, M., Bush, L.G., Hanson, G.R. and Gibb, J.W. 1993; Effects of ritanerin on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced decrease in striatal serotonin concentration and on the increase in striatal neurotensin and dynorphin concentrations. *Biochem. Pharmacol.*, 46 (4) pp 770-772.



- Johnson, M.P., Huang, X.M., Oberlender, R., Nash, J.F. and Nichols, D.E., 1990; Behavioral biochemical and neurotoxicological actions of the alpha-ethyl homologue of P-chloroamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 191 (1) pp 1-10.
- Johnson, M.P., Stone, D.M., Hanson, G.R. and Gibb, J.W., 1987; Role of the dopaminergic nigrostriatal pathway in methamphetamine-induced depression of the neostriatal serotonergic system. *Eur. J. Pharmacol.*, 135 (2) pp 231-234.
- Joyce, D. and Hurwitz, H.M.B., 1964; Avoidance behavior in the rat after 5-hydroxytryptophan (5-HTP) administration. *Psychopharmacologia.*, 5 pp 424-430.
- Kalen, P., Strecker, R.E., Rosengren, E. and Bjorkklund, A., 1988; Endogenous release of Neuronal Serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid in the caudateputamen of the rat as revealed by intracerebral dialysis coupled to high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Neurochem.*, 51 (5) pp 1422-1435.
- Kirby, R.J. and Kimble, P., 1968; Avoidance and escape behavior following striatal lesions in the rat. *Exp. Neurol.*, 20 pp 215-227.
- Kish, S.J., Shannak, H. and Hornykiewicz, O., 1987; Elevated serotonin and reduced dopamine in subregionally divided Huntington's disease striatum. *Ann. Neurol.*, 22 (3) pp 386-389.
- Knox, W.E. and Averbach, U.H., 1951; Hormonal control of triptophan peroxidase in rat. *J. Biol. Chem.*, 214 pp 307-313.
- Koe, B.K. and Weissman, A., 1966; P-chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154 pp 499-516.
- Köhler, C. and Lorens, S.A., 1978; Open field activity and avoidance behavior following serotonin depletion: a comparison of the effects of parachloroamphetamine and electrolytic midbrain raphe lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 8 pp 223-233.
- Köhler, C., Ross, S.B., Srebro, B. and Ögren, S.O., 1978; Long term biochemical and behavioral effects of P-chloroamphetamine in the rat. *Annals New York Academy of Sciences.*, 305 pp 645-663.
- Kruglikov, R.I., Chippens, G.I., Getsova, V.M., Iushin, V.A. and Mats, V. N., 1984; Mechanisms of enkephalin action on learning and memory processes. *Biol. Nauki (URSS)*, 12 pp 45-49.

- Kubo, T., Shibanoski, S., Matsumoto, A., Tsuda, K. and Ishikawa, K, 1988; Portacaval anastomosis attenuates the impairing effect of cyproheptadine on avoidance learning in rat -an involvement of the serotonergic system, *Behav. Brain Res.*, 30 pp 279-287.
- Kunzle, H. 1975; Bilateral projection from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in macaca fascicularis, *Brain Res.*, 88 pp 195-209.
- Ladinsky, H. and Consolo, S. 1974; Determination of acetylcholine and choline by enzymatic radioassay., pp 1-17, In choline and acetylcholine, *Handbook of chemical radioassay methods*, Hanin (Ed), New York, Raven Press.
- Ladinsky, H., Consolo, S., Peri, G., Crunell, V. and Samanin, R. 1977; Pharmacological evidence for a serotonergic-cholinergic link in the striatum, In D.J. Jenden (Ed), *cholinergic mechanism and psychopharmacology.*, 24, *Advances in behavioral biology* pp 615-622, New York: Plenum.
- Ladinski, H., Consolo, S., Tirelli, A.S., Forloni, G.L. and Segal, M. 1981; Regulation of cholinergic activity in the rat hippocampus: In vivo effects of oxotremorine and fenfluramine. In G. Pepeu and H. Ladinsky (Eds), *Cholinergic mechanism: Phylogenetics aspects, central and peripheral synapses and clinical significance*, 25, *Advances in behavioral biology* (pp 289-296), New York: Plenum.
- Lalonde, R. and Vikis-Freiberge, V. 1985; Manipulations of 5-HT activity and memory in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behavio.*, (USA), 22 (3) pp 377-382.
- Lamberty, Y. and Gower, A.J. 1991; Cholinergic modulation of spatial learning in mice in Morris-type water maze, *Archives Internationales of Pharmacodynamic et of the Therapic.*, 309 pp 5-19.
- Lavoi, B. and Parent, A. 1990; Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.*, 299 (1) pp 1-16.
- Leathwood, P.D. and Fernstrom, J.D. 1990; Effect of an oral tryptophan carbohydrate load on tryptophan large neutral amino acid levels in monkey brain. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, 79 (1-2) pp 25-34.
- Lee, H.E. 1987; Additive effects of apomorphine and clonidine on serotonin neurons in the dorsal raphe. *Life Sci.*, 40 (7) pp 635-642.

- Lee, E.H., and Geyer, M.A. 1984; Dopamine autoreceptor mediation of the effects of apomorphine on serotonin neurons. *Pharmacol., Biochem., Behav.*, 21 (2) pp 301-311.
- Lee, E.H., Lin, W.R., Chen, H.Y., Shiu, W.H., and Liang, K.L. 1992; Fluoxetine and 8-OH-DPAT in the lateral septum enhances and impairs retention of an inhibitory avoidance response in rats. *Physiol., Behav.*, 51 (4) pp 681-688.
- Lester, H.A. 1988; Heterologous expression of excitability proteins; route to more specific drugs?., *Science*, 241 pp 1057-1063.
- Leysen, J.E., Eens, A., Gommeren, W., Van Gompel, P., Wynants, J. and, Janssen, P.A. 1988; Identification of nonserotonergic [<sup>3</sup>H]ketanserin binding sites associated with nerve terminals in rat brain and with release of biogenic amine metabolites induced by ketanserin -and tetrabenazine-like drugs. *J. Pharmacol., Exp. Ther.*, 244 (1) pp 310-321.
- Leysen, J.E., Gommeren, W. and Janssen, P.A. 1991; Identification of non-serotonergic [<sup>3</sup>H]ketanserin binding sites on human platelets and their role in serotonin release. *Eur. J. Pharmacol.*, 206 (1) pp 39-45.
- Leysen, J.E., de Chaffoy de Courcelles, D., De Clerck, F., Niemegeers, C. J. and Van Nueten, J.M. 1984; Serotonin-S<sub>2</sub> receptor binding sites and functional correlates. *Neuropharmacology (ENGLAND)*, 23 (12B) pp 1493-1501.
- Leysen, J.E., Niemegeers, C.J.E., Tollenaere, J.P. and Leduron, P.M. 1978; Serotonergic component of neuroleptic receptors, *Nature.*, 272 pp 168-171
- Lidov, H.G.W., Grzanna, R. and Molliver, M.E. 1980; The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat. -an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 5 pp 207-227.
- Lin, R.C., Ngai, S.A. and Costa, E. 1969; Lysergic acid diethylamide: role in conversion on plasma tryptophan to brain serotonin (5-hydroxytryptamine). *Science* 166 pp 237-239.
- Liu, G.Q., Algeri, S., Ceci, A., Garattini, S., Gobbi, M. and Murai, S. 1984; Stimulation of serotonin synthesis in rat brain after antiepilepsirine, an antiepileptic piperine derivative. *Biochem. Pharmacol.*, 33 (23) pp 3883-3886..
- Lloyd, K.G. 1975; Special chemistry of the basal ganglia 2. Distribution of acetylcholine, acetyltransferase and acetylcholinesterase. *Pharmac. Therp.*, B. 1 pp 63-67.

- Lorens, S.A., 1973; Raphe lesions in rats; Forebrain serotonin and avoidance behavior, *Pharmacol, Biochem, Behav.*, 1 pp 487-490.
- Lorens, S.A., 1978; Some behavioral effects of serotonin depletion depend on method; A comparison of 5,7-dihydroxytryptamine, P-chlorophenylalanine P-Chloroamphetamine and electrolytic raphe lesions, *Ann. New York, Academia Sci.*, 305 pp 532-555.
- Loscher, W., Annies, R. and Honack, D., 1993; Comparison of competitive NMDA receptor antagonists with regard to monoaminergic neuronal activity and behavioural effects in rats, *Eur. J. Pharmacol. (NETHERLANDS)*, 242 (3) pp 263-274.
- Lovenberg, W., 1973; Tryptophan hydroxylase and serotonin synthesis in the brain., In: *Brain, Nerves and Synapses*, Bloom, F.E., Acheson, G.H. (ed), Karger, Basel, pp 232-244.
- Lovenberg, W., Jequier, I. and Sjoerdsma, A., 1968; Tryptophan hydroxylation in mammalian system. *Advan. Pharmacol.*, 6A pp 21-36.
- Lynch, G.S., Lucas, P.A. and Deawler, N.M., 1972; The demonstration of acetylcholinesterase containing neurones within the caudate nucleus of the rat. *Brain Res.*, 45 pp 617-621.
- Ma, T.C. and Yu, Q.H., 1993; Effect of 20(s)-ginsenoside-Rg2 and cyroheptadine on two-way active avoidance learning and memory in rats. *Arzneimittelforschung* 43 (10) pp 1049-1052.
- Mamounas, L.A., Mullen, C.A., O'hearn, E. and Molliver, M.E., 1991; Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivates. *J. Comp. Neurol.*, 314 (3) pp 558-586.
- Mandell, A.J. and Knapp, S., 1977; Regulation of serotonin biosynthesis in brain-role of the high affinity uptake of triptophan into serotonergic neurons. *Fed. Proc.*, 36 pp 2142.
- Mann, D.M.A. and Yates, P.O., 1983; Serotonin nerve cells in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 469 pp 96-98.
- Mantz, J., Godbout, R., Tassin, J.P., Glowinski, J. and Thierry, A.M., 1990; Inhibition of spontaneous unit activity in the rat medial prefrontal cortex by mesencephalic raphe nuclei. *Brain Res.*, 524 pp 22-30.
- Maramatsu, M., Chaki, S., Usuki-Ito, C. and Aihara, H., 1990; Attenuation of serotonin-induced suppression of [<sup>3</sup>H]acetylcholine release from rat cere-

- ... bral cortex by minaprine; possible involvement of the serotonin-2 receptor and K<sup>+</sup> channel, *Neurochem. Int.*, 16 pp 301-307.
- Maramatsu, M., Tamaki-Ohashi, J., Usuki, C., Araki, H., Chaki, S. and Aihara, H. 1988; 5-HT<sub>2</sub> antagonists and minaprine blok the 5-HT-induced inhibition of dopamine release from rat brain striatal slices, *Eur. J. Pharmacol.*, 153 (1) pp 89-95.
- Marcinkiewicz, M., Verge, D., Gozlan, H., Pichat, L. and Hamon, M. 1984; Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT<sub>1</sub> sites in the rat brain, *Brain Res.*, 291 (1) pp 159-163.
- Markowska, A.L. and Wenk, G.L. 1991; Serotonin influences the behavioral recovery of rats following nucleus basalis lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38 (4) pp 731-737.
- Marrazzi, A.S. and Hart, E.R. 1955; Relationship of hallucinogens to adrenergic cerebral neurohumors. *Science*, 121 pp 365-367.
- Martin, F. and Artigas, F. 1992; Simultaneous effects of P-chloroamphetamine, d-fenfluramine, and reserpine on free and stored 5-hydroxytryptamine in brain and blood, *J. Neurochem* 59 (3) pp 1138-1144.
- Mataga, N., Imamura, K. and Watanabe, Y. 1991; GR-tetrahydrobiopterin perfusion enhances dopamine, serotonin, and glutamate outputs in dialysate from rat striatum and frontal cortex. *Brain Res.* 551 (4) pp 64-71.
- Maura, G. and Raiteri, M. 1986; Cholinergic terminals in rat hippocampus posses 5-HT<sub>1B</sub> receptors mediating inhibition of acetylcholine release. *Eur. J. Pharmacol.*, 129 pp 333-337.
- Maura, G., Fedele, E. and Raiteri, M. 1989; Axetylcholine release from rat hippocampal slices is modulated by 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 165 pp 173-179.
- May, R. 1967; *Psychology and the Human Dilema*. W.W. Norton y co., Inc.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., Grewaal, D.S. and Singh, V.K. 1975; Striatal cholinergic interneurons and their relation to dopaminergic nerve endings. *J. Pharmacol.*, (Paris), 6 pp 143-152.
- McIntyre, I.M. and Stanley, M. 1984; Postmortem and regional changes of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and tryptophan in brain. *J. Neurochem.*, 42 (6) pp 1588-1592.

- McGonigle, P. 1988; Quantitative analysis of the interaction of [<sup>3</sup>H]spiroperidol with serotonin and dopamine receptors, *J. Cardiovas. Pharmacol.*, 11 suppl., 1 pp 73-77.
- Mendelson, S.D. and Gorzalka, B.B. 1986; Serotonin type 2 antagonists inhibit lordosis behavior in the female rat; reversal with quipazine, *Life Sci.*, 38 pp 33-39.
- Mendelson, S.D., Quartermain, D., Francisco, T. and Shemer, A. 1993; 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists induce anterograde amnesia in mice through a postsynaptic mechanism, *Eur. J. Pharmacol.*, 236 (2) pp 177-182.
- Meneses, A. 1993; Efectos del 8-OH-DPAT (agonista 5-HT<sub>1A</sub>) y de PCPA (inhibidor de la síntesis de 5-HT) en aprendizaje, XXXVI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, MEMORIAS, ACAPULCO, GRO., MEXICO.
- Meneses, A. and Hong, E. 1994a; Modification of 8-OH-DPAT effects on learning by manipulation of the assay conditions, *Behav. Neural Biol.*, 61 (1) pp 29-35.
- Meneses, A. and Hong, E. 1994b; Efectos de agonistas 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> en aprendizaje, XXXVII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, MEMORIAS, MERIDA YUCAN, MEXICO.
- Meyer, D.K., Holland, A., Lais, A. and Szabo, B. 1991; Effects of P-chloroamphetamine on release of [<sup>3</sup>H]gamma-aminobutyric acid from slices of rat caudate-putamen. *Eur. J. Pharmacol.*, 196 (2) pp 189-195.
- Middlemiss, D.N. 1984; 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin is devoid of activity at the 5-hydroxytryptamine autoreceptor in rat brain. Implications for the proposed link between the autoreceptor and the [<sup>3</sup>H]5-HT recognition site. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 327 pp 18-22.
- Middlemiss, D.N. and Fozard, J.R. 1983; 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT<sub>1</sub> recognition site, *Eur. J. Pharmacol.*, 90 pp 151-153.
- Mitchan, J.C. and Thomas, R.K. 1972; Effects of substantia nigra and caudate nucleus lesions on avoidance learning in rats., *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 81 pp 101-107.
- Miura, N., Nakata, N., Tanaka, Y., Hiraga, Y., Ikeda, Y., Ohata, H. and Iwasaki, T. 1993; Improving effects of FG-7080, a serotonin reuptake inhibitor, on scopolamine-induced performance deficits of memory tasks in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 62 (2) pp 203-206.

- Molliver, M.E., 1987; Serotonergic neuronal systems; what their anatomic organization tells us about function, *J. Clin. Psychopharmacol.*, 7 (6 suppl) pp 35-235,
- Morgan, D.C., May, P.C. and Finch, C.E., 1987; Dopamine and serotonin systems in human and rodent brain; effects of age and neurodegenerative disease. *J. Am. Geriatr. Soc.*, (USA), 35 (4) pp 334-345,
- Mori, S., Ueda, S., Yamada, H., Takino, T. and Sano, Y., 1985; Immunohistochemical demonstration of serotonin nerve fibers in the corpus striatum of the rat, cat and monkey. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 173 (1) pp 1-5.
- Morris, B.J., Reimer, S., Holtt, V. and Herz, A., 1988; Regulation of striatal prodynorphin mRNA levels by the raphe striatal pathway. *Brain Res.*, 464 (1) pp 15-22.
- Nabeshima, T., Itoh, K., Kawashima, K. and Kameyama, T., 1989a; Effects of 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist on cyclohexamide-induced amnesia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 32 (3) pp 787-790.
- Nabeshima, T., Kawashima, K. and Kameyama, T., 1989b; Effect of minaprine on cycloheximide-induced amnesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 169 (2-3) pp 249-257.
- Nakada, M.T., Wieczorek, C.M. and Rainbow, T.C., 1984; Localization and characterization by quantitative autoradiography of [<sup>125</sup>I]LSD binding sites in rat brain. *Neurosc. Lett.*, 49 (1-2) pp 13-18.
- Nakahara, N., Iga, Y., Saito, Y., Mizobe, F. and Kawanishi, G., 1989; Beneficial effects of FKS-508 (AF 102B) a selective M<sub>1</sub> agonist, on the impaired working memory in AF 64A-treated rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 51 pp 539-547.
- Nakamura, S., Tani, Y., Maezono, Y., Ishihara, T. and Ohno, T., 1992; Learning deficit after unilateral AF 64A lesions in the rat basal forebrain: role of cholinergic and noncholinergic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42 (1) pp 119-130.
- Nalini, K., Karanth, K.S., Rao, A. and Aroor, A.R., 1992; Effects of piracetam on retention and biogenic amine turnover in albino rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 42 (4) pp 859-864.
- Nazarali, A.J. and Reynolds, G.P., 1992; Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: a post-mortem study. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 12 (6) pp 581-587.

- Neill, D.B. and Grossman, S.P. 1970: Behavioral effects of lesions or cholinergic blockade of dorsal and ventral caudate of rats, *J. Comp. Physiol. Behav.*, 13 pp 297-305.
- Nilsson, O.G., Strecker, R.E., Daszuta, A. and Bjorklund, A. 1988: Combined cholinergic and serotonergic denervation of the forebrain produces severe deficits in a spatial learning task in the rat, *Brain Res.*, 145 pp 235-246.
- Nishikawa, T. and Scatton, B. 1983: Evidence for a GABAergic inhibitory influence on serotonergic neurons originating from the dorsal raphe *Brain Res.*, 279 (1-2) pp 325-329.
- Nishikawa, T. and Scatton, B. 1985: Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Involvement of the habenulo-raphé pathways in the GABAergic inhibition of ascending cerebral serotonergic neurons, *Brain Res.*, 331 (1) pp 81-90.
- Nishikawa, T. and Scatton, B. 1984: The inhibitory GABAergic influence on striatal serotonergic neurons depends upon the habenulo-raphé pathways, *Brain Res.*, 304 (1) pp 157-161.
- Normile, H.J. and Altman, H.J. 1992: Effects of combined acetylcholinesterase inhibition and serotonergic receptor blockade on age-associated memory impairments in rats. *Neurobiol. Aging.*, 13 (6) pp 735-740.
- Normile, H.J. and Altman, H.J. 1988: Enhanced passive avoidance retention following postraing serotonergic receptor antagonist administration in middle-aged and aged rats. *Neurobiol. Aging.*, 9 (4) pp 377-382.
- Normile, H.J. and Altman, H.J. 1987: Serotonin, Alzheimer's disease and learning and memory in animals. In: Altman, H.J. (ed) *Alzheimer's disease: Problems, Prospects and Perspectives*. New York: Plenum, 141-156.
- Normile, H.J., Jenden, D.J., Kuhn, D.M., Wolf, W.A. and Altman, H.J. 1990: Effects of combined serotonin depletion and lesions of the nucleus basalis magnocellularis on acquisition of complex spatial discrimination task in the rat. *Brain Res.*, 536 (1-2) pp 245-250.
- Oberg, G.E. and Divac, I. 1975: Dissociative effects of selective lesions in the caudate nucleus of cats and rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 35 pp 647-659.
- O'Dell, S.J., La Hoste, G.J., Widmark, C.B., Shapiro, R.M., Potkin, S.G. and Marshall, J.F. 1990: Chronic treatment with clozapine or haloperidol differentially regulates dopamine and serotonin receptors in rat brain. *Synapse*, 6 (2) pp 146-153.



- Oelssner, W, Jr., Raubach, K.H. and Oelssner, W, 1983; Effect of in vitro serotonin on dopaminergic binding sites in rat striatal membranes, *Bio-med, Biochem. Acta (GERMANY, EAST)* 42 (7-8) PP 931-936.
- Ögren, S.O, 1982a; Central serotonin neurons and learning in the rat, In Osborne N.N, (ed), *Biology of serotonergic transmission*, John Wiley and Sons Ltd, pp 317-334.
- Ögren, S.O, 1982b; Forebrain serotonin and avoidance learning; behavioral and biochemical studies on the acute effect of P-chloroamphetamine on one-way active avoidance learning in the rat, *Pharmacol, Biochem, Behav.,* 16 pp 881-895.
- Ögren, S.O, 1986a; Analysis of the avoidance learning deficit induced by the serotonin releasing compound P-chloroamphetamine, *Brain Res Bull (USA)*, 16 (5) pp 645-660.
- Ögren, S.O, 1986b; Serotonin receptor involvement in the avoidance learning deficit caused by P-chloroamphetamine-induced serotonin release, *Acta-Physiol-Scand.,* 126 (3) pp 449-462.
- Ögren, S.O, 1985; Evidence for a Role of Brain Serotonergic Neurotransmission in Avoidance Learning, *Acta Physiol. Scand., Suppl.,* 544 pp 1-71.
- Ögren, S.O., Fuxe, K., Archer, T., Hall, H., Holm, A.C. and Köhler, C. 1981; Studies on the role central 5-HT neurons in avoidance learning: A behavioral and biochemical analysis, In: Haber, B., Gabay, S., Issidorides, M.R. and Alivisatos, S.G.A. (eds) *Serotonin: Current aspects of neurochemistry and function. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 133. Plenum Press, New York pp 681-705.
- Ohno, M., Yamamoto, T. and Watanabe, S. 1991; Blockade of 5-HT<sub>2</sub> receptors protects against impairment of working memory following transient fore-brain ischemia in the rat. *Neurosci. Lett.,* 129 (2) pp 185-188.
- Owen, M.L., Baker, G.B., Coutts, R.T. and Dewhurst, W.G. 1991; Analysis of P-chloroamphetamine and side-chain monofluorinated analogue in rat brain. *J. Pharmacol. Methods.,* 25 (2) pp 147-155.
- Palacios, J.M., Pazos, A. and Hoyer, D. 1987; Characterization and mapping of 5-HT<sub>1A</sub> sites in the brain of animals and man, In : *Brain 5-HT<sub>1A</sub> Receptors*, Dourish, C.T., Ahlenius, S., Hutson, P.H. (ed), Ellis Horwood Chichester, pp 67-81.
- Parent, A., Descarries, L. and Beaudet, A. 1981; Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after

intraventricular administration of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, *Neuroscience* 6 pp 115-138.

- Parentini, M., Tirone, F., Olgiati, V.R. and Groppeti, A. 1983; Presence of opiate receptors on striatal serotonergic nerve terminals, *Brain Res. (NETHERLANDS)*, 280 (2) pp 317-322.
- Pasik, P., Pasik, T., Holstein, G.R. and Saavedra, J.P. 1984; Serotonergic innervation of the monkey basal ganglia; an immunocytochemical, light and electron microscopy study. In: McKenzie, J.S., Kemm, R.E. and Wilcock, L.N. (eds), *The basal ganglia*, Plenum Press, New York, pp 115-129.
- Paul, V., Balaubramanian, E. and Kazi, M. 1994; The neurobehavioural toxicity of endosulfan in rats; a serotonergic involvement in learning impairment. *Eur. J. Pharmacol.*, 270 (1) pp 1-7.
- Pauwels, P.J., Palmier, C. and Briley, M. 1993; Identification of 5-hydroxytryptamine 1D binding sites in sheep caudate nucleus membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 46 (3) pp 335-338.
- Paxinos, G. and Watson, C. 1982; *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, pp 162.
- Pazos, A. and Palacios, J.M. 1985; Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors, *Brain Res.*, 346 pp 205-230.
- Pazos, A., Engel, G. and Palacios, J.M. 1985; Beta-adrenoreceptor blocking agents recognize a subpopulation of receptors in the rat brain, *Brain Res.*, 343 pp 403-408.
- Pazos, A., Hoyer, D. and Palacios, J.M. 1984; The binding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus: characterization of a new type of serotonin recognition site. *Eur. J. Pharmacol.*, 106 pp 539-546.
- Pedigo, N.W., Yamamura, H.I. and Nelson, D.L. 1981; Discrimination of multiple [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain, *J. Neurochem.*, 36 pp 220-226.
- Pelleymounter, M.A., Schlesinger, K., Wehner, J., Hall, M.E. and Stewart, J.M. 1988; Nigral 5-HT and substance P-induced enhancement of passive avoidance retention. *Behav. Brain Res. (NETHERLANDS)*, 29 (1-2) pp 159-172.

- Peroutka, S.J., and Snyder, S.H. 1979; Multiple serotonin receptors; differential binding of  $^3\text{H}$ serotonin,  $^3\text{H}$ lysergic acid diethylamide and  $^3\text{H}$ spiroperidol., *Mol. Pharmacol.*, 14 pp 687-699.
- Peroutka, S.J., Lebovits, R.M., and Snyder, S.H. 1981; Two distinct central serotonin receptors with different physiological functions, *Science*, 212 pp 827-829.
- Peroutka, S.J., McCarthy, B.G., and Guan, X. M. 1991; 5-benzzyloxytryptamine: a relatively selective 5-hydroxytryptamine 1D/1B agent, *Life Sci.* 49 pp 409-418.
- Peroutka, S.J., Switzer, J.A., Hamik, A. 1989; Identification of 5-hydroxytryptamine 1D sites in human brain membranes, *Synapse*, 3 (1) pp 61-66.
- Perry, K.W. and Fuller, R.W. 1992; Effect of fluoxetine on serotonin and dopamine concentration in microdialysis fluid from rat striatum, *Life Sci.*, 50 (22) pp 1683-1690.
- Petkov, V.D., Markouska, V.L. and Petkov, V.V. 1991; Effects of serotonergic receptor antagonists and their combination with scopolamine on memory. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.*, 17 (1) pp 21-28.
- Petkov, V.V., Stoyanova, V. and Popova, Y. 1989; Changes in the serotonin, dopamine and noradrenaline levels in the cerebral cortex of rats trained for active and passive avoidance. *Acta-Physiol-Pharmacol-Bulg.*, 15 (2) pp 28-32.
- Piha, R.J., Bergström, L., Usitalo, A.J. and Oja, S.S. 1963; Studies on the metabolism of brain proteins II. Effect of chlorpromazine and lysergic acid diethylamide on the turnover rate of rat protein brain. *Ann. Med. exp. Finn.*, 41 pp 498-515.
- Pitsikas, N., Brambilla, A. and Borsini, F. 1994; Effect of DAU 6215, a novel 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, on scopolamine-induced amnesia in the rat spatial learning task. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 47 (1) pp 95-99.
- Pletscher, A., Bartholini, G., Bruderer, W.P. and Gey, K.F. 1964; Chlorinated aralkylamines effecting the central metabolism of 5-hydroxytryptamine, *Journal of Pharmacological and experimental Therapeutics.*, 145 pp 344-350.
- Polgar, S., Sanberg, R. and Kirby, R.J. 1981; Is the striatum involved in passive avoidance behavior?. A commentary. *Physiol. Psychol.*, 9 pp 354-358

- Potter, L.T., 1970; Acetylcholine, choline acetylase and acetylcholinesterase. In A. Lajtha (Ed) Handbook of Neurochemistry, vol. IV., New York; Plenum pp 263-284.
- Prado-Alcalá, R.A., 1985; Is Cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory?, Life Sciences, 37 pp 2135-2142.
- Prado-Alcalá, R.A. and Cobos-Zapain, G.G., 1977; Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience., Brain Research., 138 pp 190-196.
- Prado-Alcalá, R.A. and Quirarte, G.L., 1993; La conducta y la mente, Información Científica y Tecnológica, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Vol. 15, Núm. 204, México.
- Prado-Alcalá, R.A., Cepeda, G., Verduzco, L., Jiménez, A. and Vargas-Ortega, E., 1984; effects of cholinergic stimulation of the caudate nucleus on active avoidance, Neurosc. Lett., 51 pp 31-36.
- Prado-Alcalá, R.A., Cruz-Morales, S.E. and López-Miro, F.A., 1980; differential effects of cholinergic blockade of anterior and posterior caudate nucleus on avoidance behaviors, Neuroscience Letters, 18 pp 339-345.
- Prado-Alcalá, R.A., Grinberg-Zylberbaun, J., Alvarez-Leefmans, F.J., Gómez, A.G., Singer, S. and Brust-Carmona, H., 1972; A possible caudate-cholinergic mechanism in the two instrumental conditioned responses, Psychopharmacologia (Berl.), 25 pp 339-346.
- Prado-Alcalá, R.A., Signoret-Edward, L. and Figueroa, M., 1981; Time-dependent retention deficits induced by post-training injections of atropine into the caudate nucleus. Pharmac. Bioch. Behav., 15 pp 633-636.
- Quartermain, D., 1982; Catecholamine involvement in memory retrieval processes. In: Morrison, A.R., Strick, P.L. (eds), Changing concepts of the nervous system. Academic Press, New York.
- Quartermain, D. and Altman, H.J., 1982; Facilitation of retrieval by d-amphetamine following anisomycin-induced amnesia. Physiol. Psychol., 10 pp 283-292.
- Quartermain, D., Clemente, J. and Shemer, A., 1993; 5-HT<sub>1A</sub> agonists disrupt memory of fear conditioning in mice. Biol. Psychiatry, 33 (4) pp 247-254
- Quik, M., Iversen, L.L., Larder, A. and Mackay, A.V.P., 1978; Use of ADTN to define specific [<sup>3</sup>H]spiperone binding to receptors in brain. Nature, 274 pp 513-514.

- Quirarte, G.L., 1995; Estudio sobre efectos de niveles altos y bajos de reforzamiento sobre la amnesia experimental, Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, UNAM., México.
- Quirion, R., Richard, J, and Dan, T.V, 1985; Evidence for the existence of serotonin type-2 receptors on cholinergic terminals in rat cortex, Brain Res., 333 pp 345-349.
- Radja, F., Descarries, L., Dewar, K.M, and Reader, T.A, 1993; Serotonin 5-HT1 and 5-HT2 receptors in adult rat brain after neonatal destruction of nigrostriatal dopamine neurons; a quantitative autoradiographic study. Brain Res., 606 (2) pp 273-285.
- Rapport, M.M., Green, A.A. and Page, I.H, 1948; Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterisation. J.Biol. Chem., 176 pp 1243-1251.
- Reibring, L., Agren, H., Hartuig, P., Tedroff, J., Lundquist, H., Bjurling, P., Kihlberg, T, and Langstrom, B, 1992; Uptake and utilization of [ $\beta$ - $^{11}$ C]5-hydroxytryptophan in human brain studied by positron emission tomography. Psychiatry Res., 45 (4) pp 212-225.
- Reisine, T.D., Soubrie, P., Ferron, A., Blas, C., Romo, R. and Glowinski, J, 1984; Evidence for a dopaminergic innervation of the cat lateral habenula: its role in controlling serotonin transmission in the basal ganglia. Brain Res., 308 (2) pp 281-288.
- Ricaurte, G.A., Markowska, A.L., Wenk, G.L., Hatzidimitriou, G., Wlos, J, and Olton, D.S. 1993; 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, serotonin and memory. J. Pharmacol. Exp. Ther., 266 (2) pp 1097-1105.
- Richter-Levin, G. and Segal, M. 1989a; Raphe cells grafted into the hippocampus can ameliorate spatial memory deficits in rats with combined serotonergic/cholinergic deficiencies. Brain Res., 478 pp 184-186.
- Richter-Levin, G. and Segal, M. 1989b; Spatial performance is severely impaired in rats with combined reduction of serotonergic and cholinergic transmission. Brain Res., 477 (1-2) pp 404-407.
- Riege, W.H. and Morimoto, H. 1970; Effects of chronic stress and differential environment upon brain weight and biogenic amine levels in rats. J. Comp. Physiol. Psychol., 71 pp 496-504.
- Robinson, S.E. 1983; Effect of specific serotonergic lesions on cholinergic neurons in the hippocampus, cortex and striatum. Life Sciences, 32 pp 345-353.

- Robinson, S.E., Rice, M.A. and Hambrecht, K.L. 1986; Effect of intrastriatal injection of diisopropylfluorophosphate on acetylcholine, dopamine, and serotonin metabolism, *J. Neurochem.*, 46 (5) pp 1632-1638.
- Roffman, M. and Lal, H. 1971; Facilitatory effect of amphetamine on learning and recall of avoidance response in rats, *Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie.*, 193 pp 87-91.
- Ross, S.B. 1976a; Antagonism of the acute and long-term biochemical effects of 4-chloroamphetamine on the 5-HT neurones in the rat brain by inhibitors of the 5-hydroxytryptamine uptake, *Acta Pharmacologica et toxicologica.*, 39 pp 456-476.
- Ross, S.B. 1976b; Long-term effects of N-2-chloroethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride on noradrenergic neurons in the rat brain and heart, *British Journal of Pharmacology.*, 58 pp 521-527.
- Roth, B.L., McLean, S., Zhu, X.Z. and Chuang, D.M. 1987; Characterization of two [<sup>3</sup>H]ketanserin recognition sites in rat striatum, *J. Neurochem.*, 49 (6) pp 1833-1838.
- Ruda, M.A. and Gobel, S. 1980; Ultrastructural characterization of axonal endings in the substantia gelatinosa which take up [<sup>3</sup>H]serotonin, *Brain Res.*, 184 pp 57-83.
- Rudnick, G and Wall, S.C. 1992; P-chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters, *Biochemistry*, 31 (29) pp 6710-6718.
- Sakurai, Y. and Wenk, G.L. 1990; The interaction of acetylcholinergic and serotonergic neural systems on performance in a continuous non-matching to sample task, *Brain Res.*, 519 (1-2) pp 118-121.
- Saligart, C., Chretien, P., Daoust, M., Moore, N. and Boismare, F. 1986; Dynamic characteristics of dopamine, norepinephrine and serotonin metabolism in axonal endings of the rat hypothalamus and striatum during hypoxia: a study using HPLC with electrochemical detection, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 8 (6) pp 343-349.
- Saltzman, A.G., Morse, B., Whitman, M.M., Ivanshchenko, Y., Jaye, M. and Felder, S. 1991; Cloning of the human serotonin 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> receptor subtypes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181 (3) pp 1469-1478.
- Samanin, R., Quattrone, A., Peri, G., Ladinski, H. and Consolo, S. 1978; Evidence for interactions between serotonergic and cholinergic neurons in the corpus striatum and hippocampus of the rat brain, *Brain Research.*, 151 pp 73-82.

- Sanberg, P.R., Lehman, J., and Fibiger, H.C., 1978; Impaired learning and memory after kainic acid lesions of the striatum. A behavioral model of Huntington's disease, *Brain Res.*, 149 pp 546-551.
- Sandyk, R., 1992: L-tryptophan in neuropsychiatric disorders; a review, *Int. J. Neurosci.*, 67 (1-4) pp 127-144.
- Sawyer, S.F., Tepper, J.M., Young, S.J., and Groves, P.M., 1985; Antidromic activation of dorsal raphe neurons from neostriatum; Physiological characterization and effects of terminal autoreceptor activation, *Brain Res.*, 332 (1) pp 15-28.
- Scatton, B., Serrano, A., Rivot, J.P., and Nishikawa, T., 1984; Inhibitory GABAergic influence on striatal serotonergic transmission exerted in the dorsal raphe as revealed by in vivo voltammetry, *Brain Res.*, 305 (2) pp 343-352.
- Selemon, L.D., and Goldman-Rakic, P.S., 1985; Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey, *J. Neurosci.*, 5 pp 776-794.
- Sharp, T., Bramwell, S.R., Clarck, D., and Grahame-Smith, D., 1989; In vivo measurement of extracellular 5-hydroxytryptamine in hippocampus of the anaesthetized rat using microdialysis: changes in relation to 5-hydroxytryptamine in hippocampus of the anaesthetized rat using microdialysis: changes in relation to 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity. *J. Neurochem.*, 53 pp 234-240.
- Schnellmann, R.G., Waters, S.J., and Nelson, D.L., 1984: [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine binding sites: Species and tissue variation. *J. Neurochem.*, 42 pp 65-70.
- Schidt, C.J., Sullivan, C.K., and Fadayel, G.M., 1994: Blockade of striatal 5-hydroxytryptamine 2 receptors reduces the increase in extracellular concentrations of dopamine produced by the amphetamine analogue 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Neurochem.*, 62 (4) pp 1382-1389.
- Schwartz, R., and Carey, R.J., 1985; Deficits in inhibitory avoidance after neurotoxic lesions of the ventral striatum are neurochemically and behaviorally selective. *Behav. Brain Res.*, 18 (3) pp 279-283.
- Siniscalchi, A., Beani, L., and Bianchi, C., 1990: Influence of chronic chlorimipramine treatment on the serotonergic modulation of acetylcholine release from guinea pig caudate nucleus slices. *Neuropharmacology.*, 29 (11) pp 1091-1093.

- Soghomonian, J.J., Descarries, L. and Watkins, K.C, 1989; Serotonin innervation in adult rat neostriatum, II, Ultrastructural features; a radioautographic and immunocytochemical study, *Brain Res.*, 481 (1) pp 67-86.
- Solana-Figueroa, R. and Prado-Alcalá, R.A, 1990; Retrograde amnesia produced by intrastrial atropine and its recersal by choline, *Life Sciences* 46 pp 679-686.
- Spampinato, U., Esposito, E., Romandini, S. and Samanin, R, 1985; Changes of serotonin and dopamine metabolism in various forebrain areas of rats injected with morphine either systemically or in the raphe nuclei dorsalis and medianus, *Brain Res.*, 328 (1) pp 89-95.
- Spangler, E.L., Rigby, P. and Ingram, D.K, 1986; Scopolamine impairs learning performance of rats in a 14-unit T-maze, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 25 pp 673-679.
- Squire, L.R. 1987: *Memory and Brain*. Oxford University Press, New York.
- Stachowiak, M.K., Bruno, J.P., Snyder, A.M., Stricker, E.M. and Zigmond, M. J. 1984: Apparent sprouting of striatal serotonergic terminals after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats, *Brain Res.*, 29 (1) pp 164-167.
- Steindler, D.A., Isaacson, L.G. and Trosko, B.K, 1983; Combined immunocytochemistry and autoradiographic retrograde axonal tracing for identification of transmitters of projection neurons. *J. Neurosc. Methods (NETHER)* 9 (3) pp 217-228.
- Steinbusch, H.W.M, 1981: Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat -cell bodies and terminals, *Neuroscience*, 6 pp 557-618.
- Strek, K.F., Spencer, K.R. and DeNoble, V.J, 1989; Manipulation of serotonin protects against an hipoxia-induced deficit of a passive avoidance response in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 33 (1) pp 241-244.
- Stevens, L.T. and Lee, F.S. 1884: Action of intermittent pressure and of defibrinated blood upon blood vessels of frog and terrapin, *Johns Hopkins Biol. Studies.*, 3 pp 99.
- Szostak, C., Jakubovic, A., Phillips, A.G. and Fibiger, H.C, 1986; Bilateral augmentation o dopaminergic and serotonergic activity in the striatum and serotonergic activity in the striatum and nucleus accumbens induced by conditioned circling. *J. Neurosc.*, 6 (7) pp 2037-2044.



- Tagliamonte, A., Tagliamonte, P., Pérez-cruet, J., and Gessa, G.L., 1971; Increase of brain tryptophan caused by drugs which stimulate serotonin synthesis, *Nature*, 29 pp 126-127.
- Takeuchi, Y., Sawada, T., Blunt, S., Jenner, P., and Marsden, C.D., 1991; Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway on striatal serotonin innervation in adult rats, *Brain Res* 562 (2) pp 301-305.
- Tamir, H., Liu, K.P., Hsiung, S.C., Yu, P.Y., Kirchgessner, A.L., and Gershon, M.D., 1991; Identification of serotonin receptors recognized by anti-idiotypic antibodies, *J. Neurochem.*, 57 (3) pp 930-942.
- Tonge, J.R., and Leonard, B.E., 1970; The effect of hallucinogenic drugs on the aminoacid precursors of brain monoamines, *Life Sci.*, 9 pp 1327-1335.
- Trulson, M.E., and Jacobs, B.L., 1976; Behavioral evidence for the rapid release of CNS serotonin by PCA and fenfluramine. *European Journal of Pharmacology.*, 36 pp 149-154.
- Twarog, B.M., and Page, J.H., 1953; Serotonin content of some mammalian tissues and urine and method for its determination, *J. Physiol. (London)*, 175 pp 157-161.
- Udenfriend, S., Christenson, J.G., and Sairman, W., 1973; Decarboxylation of 5-hydroxytryptophan, In: *Brain, Nerves and Synapses*, Bloom, F.E., Acheson, G.H. (ed), S. Karger, Basel., pp 245-256.
- Ungerstedt, U., 1971; Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand. (suppl.)*, 367 pp 1-48.
- Valzelli, L. and Pawlowski, L., 1979; Effect of P-chlorophenylalanine on avoidance learning of two differentially housed mouse strains. *Neuropsychobiology*, 5 pp 121-128.
- Van Der Kooy, D. and Hattori, T., 1980; Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: A fluorescent retrograde double labeling study in the rat. *Brain Research.*, 186 pp 1-7.
- Vanderwolf, C.H., 1987; Near total loss of "learning" and "memory" as a result of combined cholinergic and serotonergic blockade in the rat. *Behav. Brain Res.*, 23 pp 43-57.

- Van Luijtelaar, M.G., Wouterlood, F.G., Tonnaer, J.A. and Steinbusch, H.W., 1991; Ultrastructure of aberrant serotonin-immunoreactive fibers in the caudate-putamen complex of the aged rat, *Synapse*, 8 (3) pp 162-168.
- Verduzco, V.L., Cepeda, C.G. and Prado-Alcalá, R.A., 1979; Núcleo Caudado y Aprendizaje, XIII, Efectos de la microinyección de la colina y escopolamina sobre una tarea de prevención activa, en ratas, III Natl. Congr. Pharmacol., México.
- Volger, B.W., 1991; Alternatives in the treatment of memory loss in patients with Alzheimer's disease, *Clin. Phar. (USA)*, 10 (6) pp 447-456.
- Volpe, S.T., Hendrix, C.S., Park, D.H., Towle, A.C. and Davis, H.P., 1992; Early post-natal administration of 5,7-dihydroxytryptamine destroys 5-HT neurons but does not affect spatial memory, *Brain Res.*, 589 (2) pp 262-267.
- Vorhees, C.V., Schaefer, G.J., Barret, R.J., 1975; P-chloroamphetamine; Behavioral effects of reduced cerebral serotonin in rats. *Pharmacol. Biochem Behav.*, 3 pp 279-284.
- Waeber, C. and Palacios, J.M., 1989; Serotonin-1 receptor binding sites in the human basal ganglia are decreased in Huntington's chorea but not in Parkinson's disease; a quantitative in vitro autoradiography study, *Neuroscience*, 32 (2) pp 337-347.
- Waeber, C., Schoeffter, P., Palacios, J.M. and Hoyer, D., 1988; Molecular pharmacology of 5-HT<sub>1D</sub> recognition sites; radioligand binding studies in human, pig and calf brain membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 337 (6) pp 595-601.
- Walker, P.D., Riley, L.A., Hart, R.P. and Jonakait, G.M., 1991; Serotonin regulation of tachykinin biosynthesis in the rat neostriatum. *Brain Res.* 546 (1) pp 33-39.
- Wang, S.S. and Peroutka, S.J., 1988; Historical perspectives, In: *The Serotonin Receptors*, Sanders-Bush, E (ed), Humana Press, Clifton, pp 3-20.
- Wenk, G.L. and Engisch, K.L., 1986; [<sup>3</sup>H]ketanserin (serotonin type-2) binding increases in rat cortex following basal forebrain lesions with ibotenic acid. *L. Neurochem.*, 47 pp 845-850.
- Westerink, B.H., De Boer, P., Timmerman, W., De Uries, J.B., 1990; In vivo evidence for the existence of autoreceptors on dopaminergic, serotonergic, and cholinergic neurons in the brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 604 pp 492-504.

- Wetzel, W., Getsova, V.M., Jork, R, and Matthies, H, 1980; Effect of serotonin on Y-maze retention and hippocampal protein synthesis in rats, *Pharmacol. Biochem. Behavi.*, 12 pp 319-322.
- White, F.J., Simmons, M.A., West, K.B., Hoohean, A.M, and Appel, J, E, 1980; The effect of serotonin depletion on the discriminability of LSD, *Pharmacol-Bioch-Behav.*, 13 (4) pp 569-574.
- Winocur, G, 1974; Functional dissociation within the caudate nucleus of rats, *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 86 pp 432-439.
- Wong, D.F., Lever, J.R., Hartig, P.R., Dannals, R.F., Villemagne, V., Hoffman, B.J., Wilson, A.A., Ravert, H.T., Links, J.M., Scheffel, U, and col, 1987; Localization of serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors in living human brain by positron emission tomography using Ni-(<sup>11</sup>C)-methyl)-2-Br-LSD, *Synapse*, 1 (5) pp 393-398.
- Woolley, D.W, and Shaw, E.N, 1954; A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 40 pp 228-231.
- Woolley, D.W. and Van der Hoeven, T, 1963; Alteration in learning ability caused by changes in cerebral serotonin and catecholamines. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 139 pp 610-611.
- Wyatt, R.J., Termine, B.A. and Davis, J, 1972; Biochemical and sleep studies of Schizophrenia: a review of the literature 1960-1970. *Schizophrenia Bull.*, 4 pp 10-66.
- Yamamoto, T, and Hirano, A, 1985; Nucleus raphe dorsalis in Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles and loss of large neurons, *Ann Neurol.*, 17 pp 573-577.
- Young, W.S., Alheid, G.F, and Heimer, L, 1984; The neural pallidal projection to the mediodorsal thalamus: a study with fluorescent retrograde tracers and immunohistofluorescence. *J. Neurosci.*, 4 pp 1626-1638.

RETROGRADE AMNESIA PRODUCED BY INTRASTRIATAL ATROPINE  
AND ITS REVERSAL BY CHOLINE

Rafael Solana-Figueroa and Roberto A. Prado-Alcalá

Faculty of Medicine, Physiology Department, National University  
of México, P.O. Box 70-250, México, D.F. 04510, México

(Received in final form January 10, 1990)

Summary

A number of studies have shown that cholinergic blockade of the striatum produces amnesia. In the present experiment it was predicted that by increasing the synthesis of striatal acetylcholine such amnesic state would be prevented. Atropine was injected into the striatum of rats before training of passive avoidance; some of these rats were also injected, intrastrially, with choline before testing the retention of the task. Atropine alone produced amnesia while the combination of treatments reversed this effect.

All available evidence regarding the effects of direct application of acetylcholine-receptor blockers and stimulators into the striatum is consistent with the hypothesis that cholinergic activity of this structure is necessary for the consolidation and performance of instrumentally-conditioned behaviors (1). Thus, when testing the performance of lever-pressing or active avoidance intrastriatal injections of atropine or scopolamine induce an amnesic state (2, 3, 4). In marked contrast, when acetylcholine (ACh) or choline are injected significant improvements in performance are observed (5, 6, 7; but see 8, 9, and 10).

Further support for the cholinergic hypothesis has been provided in experiments dealing with passive avoidance. Application of antimuscarinic drugs into the anterior striatum produces a significant deficit in consolidation (11, 12); this deficit is both time- and dose-dependent, and is not found when the drugs are injected outside this region (e. g., posterior striatum, hippocampus and parietal cortex) (11, 12, 13). In addition, a long-lasting deficit in passive avoidance is seen after specific lesions to the striatal cholinergic interneurons (14), and an increased release of ACh from the striatum, but not from the hippocampus, can be measured shortly after training of this task (15).

To our knowledge, there have been no attempts at attenuating, through pharmacologic means, the amnesic states induced by intrastriatal injections of anticholinergics. If these memory deficits are in fact due to blockade of ACh receptors, then it would be expected that by increasing the availability of ACh the amnesic state would be ameliorated.

---

Requests for reprints should be addressed to R. A. Prado-Alcalá. This work was supported by Fundación Miguel Alemán, A.C. We thank Ernestina Tirado and Yolanda Quintana for their excellent technical assistance.

In the present experiment rats were trained to avoid a footshock while under the effects of an injection of atropine, a competitive antagonist of ACh, into the striatum. Twenty-four hr later some animals were injected in the same locus with choline, shortly before testing retention of the task. Choline was used because it can be taken-up by cholinergic neurons to accelerate the synthesis of ACh (16, 17). As expected, the combined treatments attenuated the amnesic state that had been produced by atropine alone.

#### Methods

Animals. One hundred and ten experimentally naive male Wistar rats, weighing between 250 and 350 g were used. They were individually housed and had free access to solid food and tap water in their home cages. Under Nembutal anesthesia (50 mg/kg) double-walled cannulae (21 and 27 hypodermic needle tubing) were bilaterally implanted in the anterior striatum or in the cerebral cortex, overlying the striatum (A = 9.0, L = 3.0, H = -3.5 and A = 9.0, L = 3.0, H = -0.5, respectively). The upper incisor bar was positioned 3.3 mm below the interaural line. Stereotaxic coordinates were obtained from Paxinos and Watson (18). These animals were allowed 6-8 days to recover from surgery before training was initiated. A group of unimplanted animals was also studied.

Apparatus. Training and testing were carried out in a wooden box with two compartments of the same size (30 x 30 x 30 cm), separated by a guillotine door. The lid of each compartment and the guillotine door were made of transparent, orange-colored lucite. The floor of one of the compartments was a grid made of aluminum bars (6 mm in diameter), separated 1.5 cm center-to-center. The V-shaped lateral walls of the second compartment were stainless steel and each was continuous with half the floor; there was a 1.5 cm slot separating each half-floor. Thus, when in this compartment, the rats were in contact with both walls which could be electrified by use of a stimulator that delivered scrambled constant current (BRS/LVE, model SGS-003). Illumination was provided by a 10-Watt light bulb located in the center of the lid of the gridded compartment. The conditioning box was located inside a dark, sound deadening room, provided with background masking noise (BRS/LVE, model AU-902).

#### Procedure

Training and Testing. During training each animal was put inside the gridded compartment of the conditioning box; ten sec later the door between compartments was opened and the latency to enter the darker (electrifiable) compartment with all four paws was measured. Once in the second compartment the door was closed and a footshock (4.0 mA)\* was applied through the stainless steel plates; after five sec the door was reopened, thus allowing the animal to escape to the first compartment and to remain there for 30 sec before being put back in its home cage. Twenty-four hr later a test of retention was programmed exactly as the training session, except that the footshock was not delivered. If a rat did not cross within 600 sec to the compartment where the footshock had been given the session was ended and a score of 600 as assigned.

Treatments. One injection of atropine sulphate (Sigma), dissolved in isotonic saline solution (NaCl), or of NaCl was made through the implanted cannulae, six min before training, to rats of independent groups. In some groups, an additional injection of atropine, choline chloride (Sigma), also dissolved in

\* This intensity was calculated so that the net density of current (i.e., the total amount of current received by the animals, and hence the aversiveness of the stimulation) is equivalent to lower footshock intensities used in previous work, where DC constant current stimulators were used (for references see 1).

NaCl, or NaCl was delivered through the cannulae six min before retention testing. The injection procedure was carried out in a room different from the room where training and testing took place. All infusions were bilateral, in a volume of 3  $\mu$ l through each cannula, delivered at a rate of 1  $\mu$ l/1 min; after injecting the solution the injectors were left inside the cannulae for an additional min. During the procedure the rats could move freely in their home cages, thus avoiding stress reactions that could confound the results of the experiment.

Groups. Each animal was randomly assigned to one of nine groups, which were given the treatments presented in Table I.

TABLE I

GROUP	n	Injection site	- 6 Min T	- 6 Min R
1	11	Unimplanted		
2	10	CORTEX	A 40	
3	11	STRIATUM	NaCl	NaCl
4	11	STRIATUM	A 40	
5	9	STRIATUM	A 40	A 40
6	8	STRIATUM	A 40	C 3
7	9	STRIATUM	A 40	C 6
8	10	STRIATUM	A 40	C 15
9	10	STRIATUM	A 80	C 6

Abbreviations are as follows: n, sample size; - 6 Min T, injected 6 min before training; - 6 Min R, injected 6 min before retention testing; A, atropine; NaCl, isotonic saline solution; C, choline. The doses shown next to the drugs refer to the salt (micrograms).

Histology. Upon completion of the experiment all rats with cannulae were anesthetized and intracardially perfused with isotonic saline followed by 10% Formalin; their brains were removed and kept in Formalin for at least one week before coronal sections (50  $\mu$ m thick) were made and stained with the Nissl method to determine the location of cannulae tips.

Statistics. The Kruskal-Wallis analysis of variance was computed on training, retention and escape latency scores for all groups, and the Mann-Whitney U test was used, when appropriate, to compare performances between the main control (intact) group and each of the rest of the groups.

### Results

Twenty-one animals were discarded because their cannulae placements were asymmetric or outside the target areas; consequently, the statistical analyses were performed on the data derived from the remaining 89 animals, which were grouped as noted in Table I. As depicted in Figure 1, the cannulae tips of the striatal groups were located in the anterodorsal aspect of the striatum; cortical cannulae tips were lodged in the parietal cortex, within the anterior-posterior coordinates of the former groups.

The analysis of variance showed that there were no significant differences

among the groups regarding training and escape latency scores. This outcome allowed for the use of a differential score for each animal, subtracting the latency score obtained during the test session from the latency score of the training session; thus, a high score, specially one approaching 600 reflects good retention of the task, whereas low or negative scores reflect an impairment of retention. The Kruskal-Wallis test demonstrated that there were highly significant differences in retention among the groups ( $H = 21,578$ ,  $d.f = 8$ ,  $P = 0,006$ ).

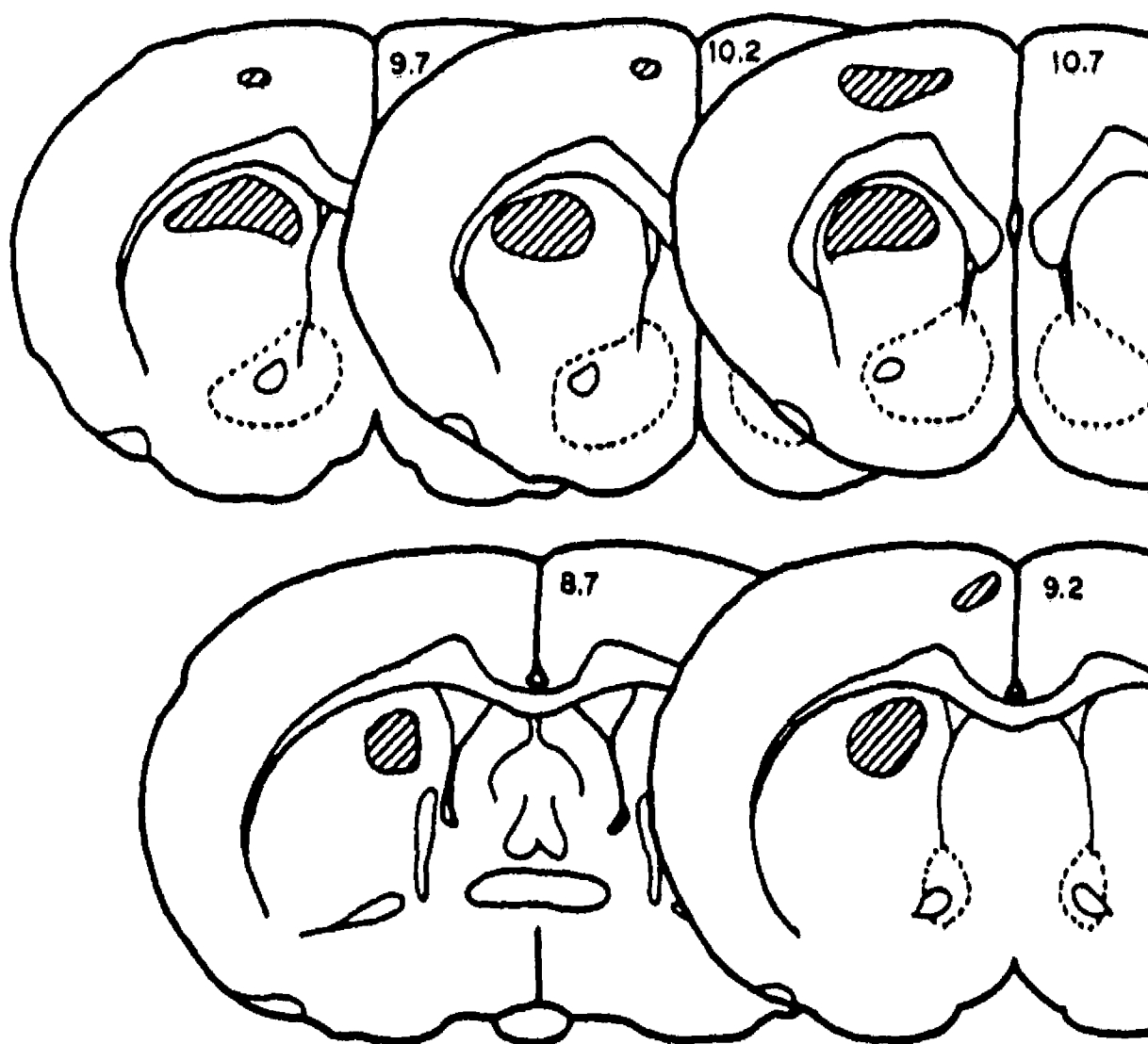


FIG. 1

Diagrammatic representation of histology sections, redrawn from Paxinos and Watson (18). The shaded areas represent the range of cannulae tip locations in the anterior striatum and in the parietal cortex. Only cannulae placements of the right hemisphere are represented.

The retention score of the intact group did not differ significantly from the retention scores of the cortical group treated with atropine, the striatal group that was injected with saline, nor from the retention score of the striatal group that received 40  $\mu$ g of atropine before training plus 6  $\mu$ g of choline before the test of retention. In contrast, highly significant differences were found after comparing the performance of the intact group against each of the rest of the striatal groups. These results are represented in Figure 2.

FALLA DE ORIGEN

### Discussion

This is the first report where an amnesic state induced by the injection of an antimuscarinic drug into the striatum was reversed by the application of choline, an ACh precursor, to this region. This finding further strengthens the hypothesis that striatal cholinergic activity is critically involved in memory processes (1).

In a previous study (12) it was found that injection of 40  $\mu$ g of atropine,

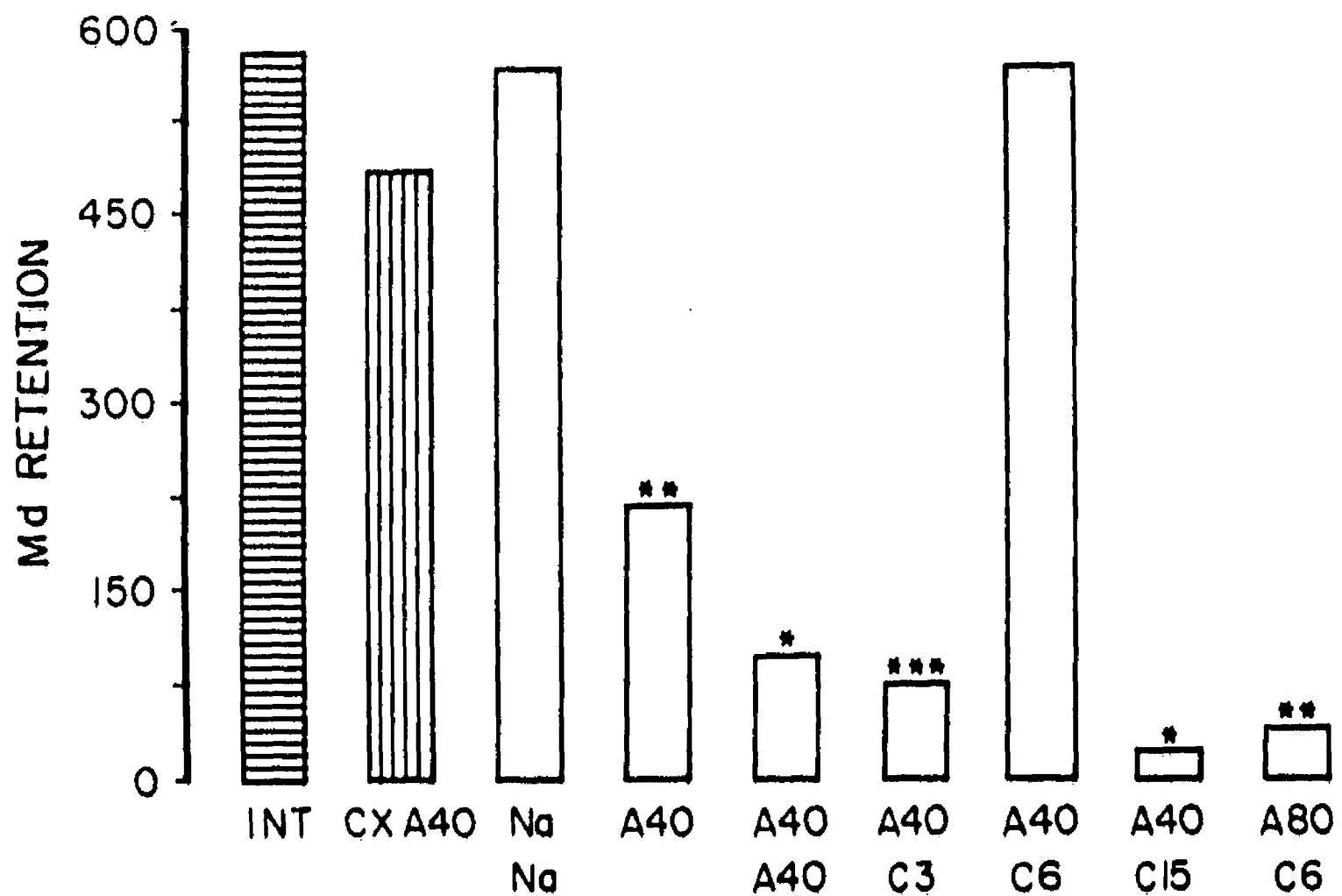


FIG. 2

Median retention scores obtained 24 hr after training. Abbreviations are as follows: INT, intact group; Na, A, and C, refer to injections of isotonic saline solution, atropine and choline, respectively, into the striatum (open bars) or parietal cortex (CX). First and second rows below the bars refer to the drug and dose ( $\mu$ g) injected six min before training and 6 min before retention testing, respectively. P values: \*, 0.05; \*\*, 0.02; \*\*\*, 0.005 with respect to the intact group.

shortly after training of passive avoidance, produced a retention deficit very similar to that seen in the present experiment. In the present experiment, however, this dose of the anticholinergic was administered before training, and the test of retention was carried out in a drug-free state or under the influence of a different drug (choline). For these reasons, the behavioral deficits that were observed could have been due to state-dependent learning.

FALLA DE ORIGEN



This possibility can be ruled out because when atropine was injected both before training and testing the retention deficit was still manifest (group 5; Table I).

Since these atropine-treated groups were trained under the influence of the drug, it could be argued that the performance deficit shown by these animals was caused by interference with non-associative functions (groups 4, 5, 6, 8 and 9; Table I). This possibility seems unlikely because during training there were no significant differences among the groups regarding latencies to cross to the shock compartment, i. e., all groups showed the same motor performance. By the same token, there were no differences in escape latencies among the groups; this result indicates that the capacity to react to the footshock was the same in all groups. Further support to the notion that acute application of atropine into the dorsal aspect of the anterior striatum does not interfere significantly with motor capabilities has been given by the demonstration that performance of a more elaborate response (lever pressing) is not altered when overtrained animals are under the effects of intrastriatal atropine (4). These results and those derived from the control for state-dependency strongly suggest that the performance deficits produced by the anticholinergic were due to an interference with memory processes.

The possibility that the improvement in performance seen in the group that was treated with 40  $\mu\text{g}$  of atropine plus 6  $\mu\text{g}$  of choline (evidenced as an increased latency to cross to the shock compartment) might have been produced by some debilitation of motor activity can be discarded since low latency scores were seen in all other striatal groups injected with the same dose of atropine, but with 3 or 15  $\mu\text{g}$  of choline, and in the animals that received 6  $\mu\text{g}$  of choline plus 80  $\mu\text{g}$  of atropine.

It has been shown that injection of atropine shortly before retention testing induces an amnesic state (12); this finding suggests that striatal cholinergic activity is also involved in retrieval processes involved in memory. Further evidence for this proposition was given in experiments where application of choline into the striatum before testing the execution of passive (5) and active (6) avoidance resulted in improved performance. In the case of an appetitively-reinforced behavior (7) low doses of this ACh precursor (5.0 and 7.5  $\mu\text{g}$ ) induced an improvement, and a high dose (15.0  $\mu\text{g}$ ) induced a deficit in performance.

Intravenous administration of choline induces the synthesis of ACh in a linear fashion with respect to time; the rate of synthesis is at least three times greater in the corpus striatum than in the cortex and becomes evident in less than two min (19). Furthermore, Haubrich et al. found that ACh synthesis in the striatum is increased in a dose-response manner after choline injections into the cerebral ventricles (20). These researchers also reported that the increase in the concentration of free choline *in vivo* is below that necessary for a maximal rate of synthesis of ACh. Several authors have concluded that newly taken up choline is preferentially used by the cholinergic nerve endings for the synthesis of a pool of ACh which is more readily released than pre-formed ACh stored in the tissue (21, 22, 23). These data permit the postulation that the effects seen in our experiment were due to de novo synthesis of ACh, as expressed below.

In line with the behavioral findings previously described, in the present experiment the lower dose of choline (3.0  $\mu\text{g}$ ) did not revert the amnesic state induced by atropine. It is assumed that such low dose failed to increase the synthesis of ACh to a level sufficient to overcome the disrupting effect produced by the atropine.

The protective effect of choline against atropine-induced amnesia was clearly seen in the group that received 6  $\mu$ g of the precursor; this finding suggests that with this dose more ACh was produced, and a greater number of ACh receptors became active, thus counteracting the effects of atropine, allowing this group to perform as good as any of the control groups. This idea is congruent with the result seen after this same dose of choline was injected to the group that had received the higher dose of atropine (80  $\mu$ g). In this case, the amnesic effect was still evident; it is proposed that this was so because a larger population of ACh-receptors had been blocked and the amount of choline-induced synthesis of ACh was insufficient to counteract the effects of such blockade.

With the higher dose of choline, and the corresponding increased synthesis and release of ACh, a sustained depolarization of cholinceptive neurons would ensue, which would be similar to that produced at the neuromuscular junction (24), thus producing a decrement in performance. Alternatively, as the synthesis and release of ACh are enhanced, different populations of neurons become affected, some of which are inhibited and some activated (25), thus producing disruptive effects on memory functions.

The present results point to the conclusion that striatal cholinergic interneurons play a crucial role in memory processes, but more research is needed to elucidate the manner in which this role is played.

#### References

1. R.A. PRADO-ALCALA, *Life Sci*, 37 2135-2142 (1985).
2. F. BERMUDEZ-RATTONI, M. MUJICA-GONZALEZ and R.A. PRADO-ALCALA, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 715-719 (1986).
3. D.B. NEILL and P.S. GROSSMAN, *J. comp. physiol. Psychol.* 71 311-317 (1970).
4. R.A. PRADO-ALCALA and G.G. COBOS-ZAPIAIN, *Brain Res.* 138 190-196 (1977).
5. S.M. FERNANDEZ, M.H. SOLODKIN and R.A. PRADO-ALCALA, *Soc. Neurosci. Abstr.* 3 232 (1977).
6. R.A. PRADO-ALCALA, G. CEPEDA, L. VERDUZCO, A. JIMENEZ and E. VARGAS-ORTEGA, *Neurosci. Lett.* 51 31-36 (1984).
7. R.A. PRADO-ALCALA and G.G. COBOS-ZAPIAIN, *Neurosci. Lett.* 14 253-258 (1979).
8. S.A. DEADWYLER, D. MONTGOMERY and E.J. WYERS, *Physiol. Behav.* 8 631-635 (1972).
9. C.D. HULL, N.A. BUCHWALD and G. LING, *Brain Res.* 6 22-35 (1967).
10. J.R. STEVENS, CH. KIM and P.D. McLEAN, *Arch. Neurol. (Chic.)* 4 47-54 (1961).
11. J.W. HAYCOCK, S.A. DEADWYLER, S.I. SIDEROFF and J.L. McGAUGH, *Exp. Neurol.* 41 201-213 (1973).
12. R.A. PRADO-ALCALA, M. FERNANDEZ-SAMBLANCAT and M. SOLODKIN-HERRERA, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22 243-247 (1985).
13. R.A. PRADO-ALCALA, L. SIGNORET and M. FIGUEROA, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15 633-636 (1981).
14. K. SANDBERG, P.R. SANBERG, I. HANIN, A. FISHER and J.T. COYLE, *Behav. Neurosci.* 98 162-165 (1984).
15. L.A. BARKER, S.D. GLICK, J.P. GREEN and J. KHANDELWAL, *Neuropharmacology* 21 183-185 (1982).
16. E.L. COHEN and R.J. WURTMAN, *Life Sci.* 16 1095-1102 (1975).
17. S. TUCEK, *Acetylcholine Synthesis in Neurons*, Chapman and Hall, 259 pp., London, (1978).
18. G. PAXINOS and C. WATSON, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 162 pp., New York, (1982).
20. D.R. HAUBRICH, P.F.L. WANG, R.L. HERMAN and D.F. CLODY, *Life Sciences* 17

- 739-748 (1975),
21. D.R. HAUBRICH, P.F.L. WANG, D.E. CLODY and P.W. WEDEKING, *Life Sciences* 17 975-980 (1975),
  22. J.A. RITCHER and R.M. MARCHBANKS, *J. Neurochem.* 18 691-703 (1971),
  23. P.C. MOLENAAR, V.J. NICKOLSON and R.L. POLAK, *Brit. J. Pharmacol.* 47 97-108 (1973),
  24. E.F. BARRET and K.L. MAGLEBY, *Biology of Cholinergic Function*, Raven Press, pp. 29-100, New York, (1976).
  25. H. MacLENNAN and D.H. YORK, *J. Physiol. (Lond.)* 187 163-175 (1966),