

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

**INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES
Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL**

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE
DOPAMINA, ÁCIDO GLUTÁMICO Y GABA
EN EL ESTRIADO Y EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA

Tesis Doctoral

Alberto Porras Chavarino

Madrid, 1996

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El trabajo de investigación "Interacción de neurotransmisores y envejecimiento cerebral", que presenta D. Alberto Porras Chavarino para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección. Este trabajo es de una alta calidad científica, tal cual atestigua la serie de publicaciones internacionales realizadas por el autor a lo largo de este periodo.

Vº Bº
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

7 de octubre de 1996

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

Fdo.: FRANCISCO MORA
(Fecha y firma)

DNI

DNI 21 907 303

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Comisión Permanente del Consejo de Departamento, en su reunión de fecha 30 de septiembre de 1996, acordó admitir a trámite la Tesis Doctoral presentada por D. ALBERTO PORRA CHAVARINO, titulada: "Interacción de neurotransmisores y envejecimiento cerebral"

Fecha reunión
Consejo Departamento
30 septiembre 1996



Director del Departamento

Fdo.: F. Mora Teruel
(Fecha y firma)

Llevar a término un trabajo de investigación, aún de la humildad de éste, requiere, siempre, el esfuerzo de un grupo de personas. Quisiera hacer público aquí mi agradecimiento hacia ellos.

Agradecimiento que, en muchas ocasiones, me resulta difícil expresarles en privado.

Me parece obligado empezar reconociendo a mis padres, y a toda mi familia, la misma posibilidad de poder dedicarme a la investigación durante estos años. Esa posibilidad se materializó al aceptarme el profesor Francisco Mora en su laboratorio. A él le debo haber llevado a cabo este Tesis Doctoral, tanto por permitirme trabajar con él como por el estímulo que de él he recibido. No quiero dejar de mencionar a la Dra. Manuela Cobo, que guió mi aprendizaje inicial.

Durante estos años he compartido muchas horas de trabajo, de entusiasmo y de desaliento con mis compañeros de laboratorio. Agredecérles aquí su compañía, su amistad y su ayuda es una expresión mínima de lo que siento por ellos, pero me parece obligado hacerlo. Macu Expósito, Belén Sanz y Gregorio Segovia me han ayudado en la realización de parte de los experimentos de este trabajo. A sus consejos y aliento, junto a los de Alberto del Arco y Rodrigo Martínez, les debo el haberlo mejorado en lo posible. De todos ellos he aprendido y a ellos debo el estímulo intelectual y emocional que me ha permitido concluir esta Tesis.

Toda la ayuda recibida no hubiese sido suficiente sin el apoyo constante de mi mujer, a la que tanto debo. También me ha ayudado en la composición final de este trabajo y en su corrección.

Sirva esto de excusa para expresarle aquí mi gratitud.

A la hora de agradecer la ayuda recibida, se tiende a recordar sólo a las personas que nos han ayudado en la fase final del trabajo. Soy consciente de que olvido a muchas personas sin cuyas enseñanzas no podría haber realizado este trabajo de investigación. La lista sería demasiado larga, pero su recuerdo permanece en mi memoria y mi agradecimiento a ellos no se diluye en el tiempo.

ÍNDICE

PRÓLOGO	I
ABREVIATURAS	III
INTRODUCCIÓN	1
1. ENVEJECIMIENTO CEREBRAL	1
1.1. CONCEPTO DE ENVEJECIMIENTO	1
1.2. ENVEJECIMIENTO CEREBRAL: CAMBIOS ESTRUCTURALES Y BIOQUÍMICOS	2
1.2.1. Cambios macroscópicos	2
1.2.2. Cambios microscópicos	2
1.2.2.1. Atrofia y muerte neuronal	3
1.2.2.2. Envejecimiento y células gliales	4
1.2.2. Cambios bioquímicos	4
2. NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL	7
2.1. DOPAMINA	7
2.1.1. Neurotransmisión dopaminérgica	7
2.1.1.1. Metabolismo de la DA	8
2.1.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación de la DA	8
2.1.1.3. Receptores dopaminérgicos	8
2.1.1.4. Vías dopaminérgicas	9
2.1.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica	11
2.1.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de DA en muestras de tejido cerebral	11
2.1.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la liberación de DA	11

Índice

2.1.2.3. Efectos del envejecimiento sobre los sistemas transportadores de DA	12
2.1.2.4. Efectos del envejecimiento sobre los receptores dopaminérgicos	13
2.1.2.5. Acerca del efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica	13
2.2. ÁCIDO GLUTÁMICO	14
2.2.1. Neurotransmisión glutamatérgica	14
2.2.1.1. Metabolismo del GLU	14
2.2.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación del GLU	14
2.2.1.3. Receptores glutamatérgicos	15
2.2.1.4. Vías glutamatérgicas	17
2.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica	19
2.2.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de GLU en muestras de tejido cerebral	19
2.2.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la liberación de GLU	20
2.2.2.3. Efectos del envejecimiento sobre los sistemas transportadores de GLU	21
2.2.2.4. Efectos del envejecimiento sobre los receptores glutamatérgicos	21
2.2.2.5. Acerca del efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica	22
2.3. GABA	23
2.3.1. Neurotransmisión gabérgica	23
2.3.1.1. Metabolismo del GABA	23
2.3.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación del GABA	24
2.3.1.3. Receptores gabérgicos	24
2.3.1.4. Vías gabérgicas	25
2.3.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión gabérgica	28
2.3.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de GABA en muestras de tejido cerebral	28
2.3.2.2. Efectos del envejecimiento sobre los receptores gabérgicos	28
3. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES	29
3.1. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN EL ESTRIADO	29
3.1.1. Conexiones neurales y neurotransmisores del estriado	29
3.1.2. Interacción de neurotransmisores en el estriado de la rata	33
3.1.2.1. Efecto de agonistas y antagonistas glutamatérgicos	33
3.1.2.2. Efecto de agonistas y antagonistas dopaminérgicos	34
3.1.2.3. Efecto de agonistas y antagonistas gabérgicos	34

3.2. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN LA CORTEZA PREFRONTAL	35
3.2.1. Conexiones neurales y neurotransmisores de la corteza prefrontal	35
3.2.2. Interacción de neurotransmisores en la corteza prefrontal de la rata	37
4. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL: PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	39
MATERIAL Y MÉTODOS	43
1. ANIMALES	43
2. MATERIAL	43
2.1. CONSTRUCCIÓN DE IMPLANTES PARA LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL <i>IN VIVO</i>	43
2.2. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE CÁNULAS <i>PUSH-PULL</i>	43
2.3. PREPARACIÓN DE EQUITHESIN	45
3. MÉTODOS EXPERIMENTALES	45
3.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO ESTEREOTÁXICO	45
3.2. PERFUSIÓN INTRACEREBRAL <i>IN VIVO</i>	46
3.3. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	47
3.3.1. Cuantificación de aminoácidos como OPA-derivados	47
3.3.2. Condiciones cromatográficas	48
3.2.2.1. Factor de dilución	49
3.2.2.2. Calibración	49
3.2.2.3. Coeficiente de variación	49
3.2.2.4. Linealidad del análisis cromatográfico	50
3.4. COMPROBACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LAS CÁNULAS	50
4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS	51
RESULTADOS	53
1. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO: ESTUDIOS EN EL ESTRIADO	53
1.1. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en el estriado de la rata adulta joven	53
1.2. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en el estriado de la rata de edad media	53
1.3. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en el estriado de la rata vieja	54
1.4. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en el estriado de la rata a lo largo del envejecimiento	54

Índice

1.5. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en el estriado de la rata adulta joven	54
1.6. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en el estriado de la rata de edad media	55
1.7. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en el estriado de la rata vieja	55
1.8. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en el estriado de la rata a lo largo del envejecimiento	55
1.9. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLN en el estriado de la rata a lo largo del envejecimiento	55
2. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO: ESTUDIOS EN LA CORTEZA PREFRONTAL	67
2.1. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal de la rata adulta joven	67
2.2. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal de la rata de edad media	67
2.3. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal de la rata vieja	67
2.4. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal de la rata a lo largo del envejecimiento	67
2.5. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal de la rata adulta joven	68
2.6. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal de la rata de edad media	68
2.7. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal de la rata vieja	68
2.8. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal de la rata a lo largo del envejecimiento	68
2.9. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLN en la corteza prefrontal de la rata a lo largo del envejecimiento	69

DISCUSIÓN	79
1. ACERCA DE LOS MÉTODOS	79
1.1. SOBRE EL MÉTODO DE PERFUSIÓN INTRACEREBRAL <i>IN VIVO</i>	79
1.1.1. Comparación de las técnicas de perfusión intracerebral: diálisis vs. <i>push-pull</i>	80
1.1.2. Limitaciones de la técnica de perfusión intracerebral <i>push-pull</i>	80
1.2. SOBRE EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS	83
1.2.1. De la derivación y cuantificación de aminoácidos	83
1.2.2. De las condiciones cromatográficas	84
1.2.3. De la variabilidad del método de análisis	84
2. ACERCA DE LOS RESULTADOS	85
2.1. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN EL ESTRIADO DE LA RATA	85
2.1.1. Interacción DA-GLU en el estriado de la rata	86
2.1.1.1. ¿Liberación de GLU o inhibición de su recaptación?	86
2.1.1.2. Liberación de GLU ¿vesicular o citoplasmática?	86
2.1.1.3. Liberación citoplasmática de GLU ¿de origen neuronal o de origen glial?	88
2.1.1.4. Otras posibilidades	89
2.1.2. Interacción DA-GABA en el estriado de la rata	89
2.2. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA	90
2.2.1. Interacción DA-GLU en la corteza prefrontal de la rata	90
2.2.2. Interacción DA-GABA en la corteza prefrontal de la rata	91
2.3. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO	92
2.3.1. Sobre las dificultades de interpretación de los estudios sobre envejecimiento	92
2.3.2. Efecto del envejecimiento sobre las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN	92
2.3.3. Interacción de neurotransmisores y envejecimiento: estudios en el estriado de la rata	93
2.3.4. Interacción de neurotransmisores y envejecimiento: estudios en la corteza prefrontal de la rata	94
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	99

PRÓLOGO

La presente Tesis Doctoral lleva por título: *Interacción de neurotransmisores y envejecimiento cerebral*, y por subtítulo: *estudio de la interacción entre dopamina, ácido glutámico y GABA en el estriado y en la corteza prefrontal de la rata*. Se trata, por tanto, de la memoria de un trabajo experimental que se ha llevado a cabo utilizando como sujetos de estudio ratas y como objeto de estudio dos estructuras cerebrales de este animal y tres neurotransmisores; y ello con el fin de estudiar la interacción de neurotransmisores durante el envejecimiento. Por tanto, en todo lo que sigue, si bien se darán notas de los aspectos básicos de cada asunto tratado, se hará especial referencia siempre a estas palabras clave (rata, estriado, corteza prefrontal, dopamina, ácido glutámico y GABA). Se entenderá, así, que al tratar el aspecto de los cambios macroscópicos y microscópicos que ocurren en el cerebro durante el envejecimiento, no se haga una descripción extensa y se aluda, sobre todo, a los conocimientos que tenemos sobre la rata. Igualmente, al tratar sobre el efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión, queda sólo nombrada la acetilcolinérgica, por

ejemplo, y se extiende más el capítulo dedicado a la glutamatérgica. Por esta misma razón, se hacen referencias mínimas a la especie humana y, en todo caso, señalando expresamente cuando es así.

La cantidad de publicaciones que podrían manejarse a la hora de escribir una Tesis Doctoral es enorme. Con el fin de moderar esta ingente cantidad de publicaciones, en muchos casos se han utilizado revisiones actuales sobre los aspectos tratados. De esta forma también se restringe el extenso apartado bibliográfico de esta Tesis Doctoral, puesto que el objetivo de este trabajo no es exclusivamente de revisión bibliográfica. Se da referencia, eso sí, de las publicaciones que contienen afirmaciones controvertidas o aspectos especialmente interesantes para la discusión.

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca predoctoral de la Universidad Complutense de Madrid y a la financiación de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica a través de los proyectos PB90-0252 y PB93-0075, cuyo investigador principal es el Dr. Francisco Mora.

ABREVIATURAS

ACH	Acetilcolina
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
AP4	2-amino-4-fosfonobutirato
APO	Apomorfina
DA	Dopamina
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GABA-T	Ácido gamma-aminobutírico-transferasa
GAD	Ácido glutámico decarboxilasa
GLN	Glutamina
GLU	Ácido glutámico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KA	Kainato
LCRs	Líquido cefalorraquídeo sintético
mGluR	Receptor glutamatérgico metabotrópico
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	O-ftaldialdehido

INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

El envejecimiento se ha convertido en objeto prioritario de la investigación bio-sanitaria en las últimas dos décadas. Este auge de la investigación sobre el envejecimiento se explica por el aumento que la proporción de población anciana está teniendo en las sociedades occidentales. Por ejemplo, en España la población de más de 65 años suponía en 1950 el 7.2% de la población total; en 1991 supone el 13.8% (Anuario estadístico de España, INE, Madrid, 1995).

1.1. CONCEPTO DE ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es la etapa final de la vida de los seres vivos, caracterizada por una pérdida progresiva de las funciones propias de la madurez y que culmina en la muerte del individuo.

Es difícil determinar cuándo comienza la vejez. En el ser humano se suele considerar, actualmente, que el periodo de vejez comienza en torno a los 65 años. En el caso de la raza Wistar (la que se usa en el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral), la mayoría de las publicaciones utilizan como animales viejos ratas de a partir de 18-20 meses de edad. Sin

embargo, debe subrayarse que la edad de inicio del proceso de envejecimiento varía entre individuos de una misma especie. Por ejemplo, las capacidades cognitivas, sensoriales y motoras pueden sufrir déficits no patológicos en muchos individuos antes de la edad considerada como límite entre el periodo adulto y el de vejez. Este hecho pone de relieve la dificultad de delimitar esa etapa de la vida llamada vejez utilizando como único criterio la «*edad cronológica*» (el número de años de vida) de los individuos.

Se han propuesto otras variables diferentes de la edad cronológica para definir la vejez, por ejemplo la «*edad biológica*» definida por el grado de funcionamiento del organismo. Sin embargo, definir la vejez de acuerdo al grado de funcionamiento no es posible mientras no dispogamos de parámetros para delimitar qué grado funcional es el característico de un individuo anciano. Por tanto, la edad cronológica es la única variable objetiva de que disponemos actualmente para definir la vejez.

El envejecimiento es un proceso universal y normal, es decir, aunque conlleva una mayor susceptibilidad a sufrir enfermedades, el envejecimiento no es una acumulación de

Introducción

patologías. Este es, precisamente, uno de los principales factores que afectan a la interpretación de los resultados de los estudios sobre el envejecimiento: la dificultad de diferenciar entre los cambios primarios (debidos al envejecimiento *per se*) y los cambios que son consecuencia de patologías.

Desde el punto de vista de la conducta, el envejecimiento se caracteriza por la pérdida de capacidad en funciones sensoriales, motoras y cognitivas (ver p.ej. Jolles *et al.*, 1986; Katzman y Terry, 1992).

En relación con las funciones sensoriales y motoras, en los individuos viejos se han descrito deficiencias en tareas de percepción visual, auditiva y táctil, así como una disminución de la velocidad de realización de los movimientos simples (que parece relacionarse más con limitaciones musculares que con factores nerviosos) y un déficit de la coordinación de movimientos complejos (que se relaciona más con limitaciones neurológicas).

Las alteraciones cognitivas más llamativas en los individuos ancianos son las que afectan a la memoria. Aunque en los humanos estas alteraciones son más intensas en las demencias, también están presentes en los individuos viejos sanos. Los déficits de memoria de los ancianos afectan, fundamentalmente, a la memoria a corto plazo así como a la adquisición y consolidación de información nueva y a la evocación de esta información (memoria a largo plazo).

Los déficits funcionales que aparecen durante el envejecimiento (señalados aquí de forma muy esquemática) son consecuencia de las modificaciones estructurales (anatómicas e histológicas) y bioquímicas que ocurren en el Sistema Nervioso durante este proceso de envejecimiento.

1.2. ENVEJECIMIENTO CEREBRAL: CAMBIOS ESTRUCTURALES Y BIOQUÍMICOS

1.2.1. Cambios macroscópicos

Los cambios morfológicos descritos en el cerebro durante el proceso de envejecimiento incluyen disminuciones del peso y del volumen cerebral. Por ejemplo, en el humano, se ha descrito una disminución de en torno al 10% del peso del cerebro a los 90 años con respecto al individuo adulto (ver Brody, 1990; Katzman y Terry, 1992); asimismo, la disminución del volumen cerebral se ha cuantificado en el humano en un 2% por década a partir de los 50 años, aunque esta disminución del volumen es diferente según la región cerebral estudiada.

La disminución del peso y del volumen globales del cerebro en el humano durante el envejecimiento se acompaña de un aumento del tamaño de los surcos cerebrales, una disminución del tamaño de las circunvoluciones cerebrales y un aumento del volumen de los ventrículos (ver Brody, 1990; Katzman y Terry, 1992).

Estos cambios morfológicos observados en los cerebros viejos son producto de las modificaciones histológicas y bioquímicas que tienen lugar en este órgano durante el envejecimiento.

1.2.2. Cambios microscópicos

Los cambios microscópicos que ocurren en el cerebro durante el envejecimiento parecen ser el resultado de la degeneración de las neuronas. Tales cambios aparecen no sólo en individuos viejos sino también en el cerebro de individuos que padecen ciertas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer en el caso de la especie humana. Estos cambios incluyen la presencia de gránulos de lipofucsina, gránulos basófilos y ovillos neurofibrilares en el citoplasma de las

neuronas y de placas seniles en el espacio extracelular (ver Katzman y Terry, 1992).

La presencia de gránulos de lipofuscina en el citoplasma de las células es, normalmente, expresión de que éstas están sufriendo cambios degenerativos lentos como los que ocurren durante el envejecimiento, aunque también pueden aparecer como consecuencia de lesiones crónicas. Se observan acúmulos de lipofuscina, por ejemplo, en células del corazón y del hígado como consecuencia del envejecimiento o en células de músculo estriado en extremidades paralizadas o inmovilizadas. En el Sistema Nervioso se observan gránulos de lipofuscina en las neuronas de algunas regiones cerebrales de individuos viejos (ver p. ej. la revisión de Sohal y Wolfe, 1986). Por ejemplo, en la corteza cerebral de los humanos se ha descrito que el 10% de las grandes neuronas presentan cúmulos de lipofuscina (ver Brody, 1990). La lipofuscina procede de la peroxidación de los lípidos poliinsaturados de las membranas biológicas provocada, probablemente, por radicales libres. Aún no está claro si este pigmento es sólo consecuencia de la acumulación de productos de desecho por degeneración o tras lesiones o puede producir daño celular por sí mismo.

En el citoplasma y las dendritas de ciertas neuronas (fundamentalmente neuronas piramidales de la corteza cerebral y del hipocampo) del cerebro de individuos viejos se ha descrito la presencia de pequeñas vacuolas de contenido basófilo de unos 5 μm de diámetro (Katzman y Terry, 1992). Se desconoce el significado de este fenómeno, que ha sido descrito con el nombre de degeneración gránulo-vacuolar.

Otro rasgo histológico descrito en el cerebro de individuos ancianos es la existencia de una maraña de fibrillas llamadas ovillos neurofibrilares (ver Katzman y Terry, 1992). El

núcleo de estos ovillos neurofibrilares está formado por pares de filamentos helicoidales que contienen proteínas *tau* (proteínas asociadas a los microtúbulos) anormalmente fosforiladas. Las proteínas *tau* son componentes normales de las neuronas, por lo que se acepta que los ovillos neurofibrilares derivan de las proteínas del citoesqueleto neuronal tras un proceso de degeneración. Estos ovillos aparecen fundamentalmente en el citoplasma de neuronas de la corteza cerebral frontal y temporal y del hipocampo.

Junto a estas formaciones intracelulares, en el cerebro de individuos viejos también se ha descrito la presencia en el espacio extracelular de placas neuríticas o placas seniles (Katzman y Terry, 1992). Las placas seniles son formaciones aproximadamente esféricas, con un tamaño de entre 10 y 200 μm de diámetro, que aparecen principalmente en la corteza cerebral y en el hipocampo. Están constituidas por un núcleo de sustancia amiloidea (el β -amiloide) rodeado por un anillo de fibrillas (prolongaciones neuronales degeneradas) y de células gliales. El β -amiloide está formado por un péptido (la proteína β -amiloide) que se sintetiza a partir de una proteína precursora (la proteína precursora del β -amiloide). Tanto la proteína β -amiloide como su proteína precursora se sintetizan de forma normal en neuronas y células gliales, pero la proteína β -amiloide que forma parte de las placas seniles está alterada de forma que se hace insoluble y forma el núcleo en torno al cual aparece la placa senil.

1.2.2.1. *Atrofia y muerte neuronal*

Además de los cambios histológicos descritos, durante el envejecimiento cerebral se produce atrofia y muerte de neuronas en ciertas regiones cerebrales (ver las revisiones de Coleman y Flood, 1987 y Katzman y Terry, 1992).

Introducción

La atrofia neuronal descrita durante el envejecimiento consiste en una disminución progresiva del árbol dendrítico de las neuronas y de la densidad de espinas dendríticas y, como consecuencia, del número de sinapsis de estas neuronas (Coleman y Flood, 1987; Katzman y Terry, 1992). Sin embargo, esta atrofia neuronal no parece ocurrir en todo el cerebro en las primeras fases del envejecimiento. Algunos estudios han demostrado que durante el envejecimiento cerebral normal se puede producir un crecimiento dendrítico como respuesta a la pérdida de neuronas en la corteza cerebral y el hipocampo (ver Coleman y Flood, 1987). En la rata, se ha descrito un aumento de la longitud total del árbol dendrítico de las neuronas hasta edades de en torno a los 21 meses seguida de una atrofia dendrítica a partir de los 27 meses (Coleman y Flood, 1987).

En relación con la muerte neuronal, varios estudios han demostrado que existe una disminución del número de neuronas en varias áreas cerebrales pero no en otras (ver Coleman y Flood, 1987). Por ejemplo, Mufson y Stein (1980) han descrito una disminución en la densidad de neuronas en la corteza frontal de ratas de 24 meses de edad. También en la rata, Landfield *et al.* (1981) han demostrado una disminución del 25% en la densidad neuronal en el área CA3 del hipocampo entre los 13-15 y los 25-28 meses de edad.

En todo caso, los fenómenos de degeneración y muerte neuronal parece que ocurren en toda la corteza cerebral, pero ni con la misma intensidad ni al mismo tiempo. Las regiones de la corteza más afectadas parecen ser la prefrontal y la parieto-temporal. También se produce pérdida de neuronas en el hipocampo, en la amígdala y en ciertas áreas subcorticales como el *locus coeruleus*, la sustancia negra, la *substantia innominata* (núcleo basal de Meynert) y varios núcleos hipotalámicos (p. ej. el núcleo supraquiasmático y el área preóptica medial) (Coleman y Flood, 1987).

1.2.2.2. Envejecimiento y células gliales

Durante los últimos años los estudios sobre la glía han profundizado en el conocimiento del papel que estas células pueden jugar en el funcionamiento del Sistema Nervioso (se puede consultar Yu *et al.*, 1990).

En relación con el envejecimiento, algunos estudios han sugerido que el componente glial del cerebro aumenta con la edad tanto en ratas como en humanos (Terry, 1986; Hansen *et al.*, 1987; Vázquez *et al.*, 1992). También se ha descrito un aumento relacionado con la edad de la proteína glial fibrilar (un marcador de los astrocitos) (O'Callaghan y Miller, 1991) y del ARNm para esta proteína (Nichols *et al.*, 1993) en varias estructuras cerebrales incluyendo el hipocampo y el estriado.

Basándose en estas observaciones, se ha sugerido que en el cerebro de individuos viejos existe una hiperactividad glial. Sin embargo, aún no está claro si esta hiperactividad glial es sólo una respuesta secundaria a la atrofia y muerte neuronal o si se puede asignar a la glía un papel primario en el envejecimiento cerebral.

1.2.3. Cambios bioquímicos

Los estudios bioquímicos sobre el envejecimiento cerebral no son tan extensos como los histológicos y sus resultados son contradictorios, probablemente como consecuencia de la escasez de estudios realizados en áreas cerebrales concretas. En todo caso, los cambios bioquímicos descritos parecen relacionarse con los cambios microscópicos ya mencionados.

En relación a los ácidos nucleicos, se ha descrito un aumento del contenido cerebral de ADN que podría deberse a la proliferación glial. El contenido de ARN parece disminuir con la edad en neuronas, pero se mantiene en células gliales (ver p. ej. Marotta *et al.*, 1986 y la revisión de Finch y Morgan, 1990).

En lo que se refiere a las proteínas, se ha descrito una disminución del contenido de éstas en el cerebro durante el envejecimiento, cifrada en el 5-25% entre los 30 y 90 años en la especie humana. Esta disminución del contenido de proteínas en el cerebro podría ser consecuencia de alteraciones en su síntesis, tal

y como sugiere la disminución paralela del contenido de ARN descrita en algunas neuronas (p. ej. en neuronas que contienen melatonina en sustancia negra y en neuronas piramidales de la corteza y del hipocampo) (ver Marotta *et al.*, 1986 y Finch y Morgan, 1990).

2. NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

Los cambios histológicos y bioquímicos que tienen lugar en el cerebro durante el envejecimiento pueden producir cambios en la neurotransmisión. Por ejemplo, la atrofia neuronal, que conlleva una disminución de la densidad de espinas dendríticas, puede provocar alteraciones en la transmisión nerviosa. Además, la alteración de la síntesis y degradación de las proteínas pueden tener multitud de consecuencias sobre la acción de los neurotransmisores: por ejemplo a través de la alteración de las enzimas que catalizan la síntesis o la degradación de estos neurotransmisores o mediante los cambios que pueden tener lugar en sus receptores.

Los estudios sobre las alteraciones que el envejecimiento puede producir en diferentes sistemas neurotransmisores son escasos. Probablemente, los neurotransmisores más estudiados en relación con el envejecimiento son la acetilcolina, la dopamina y la noradrenalina (ver p. ej. Pradhan, 1980; Katzman y Terry, 1992). Las vías neurales más afectadas por el proceso de envejecimiento normal parecen ser las proyecciones que, desde

el núcleo basal de Meynert, inervan la corteza cerebral (acetil-colina), las proyecciones que van desde el *locus coeruleus* a la corteza cerebral (noradrenalina) y las proyecciones que van desde la sustancia negra (*pars compacta*) al estriado (dopamina).

En esta Tesis Doctoral nos ocupamos específicamente de los efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica, glutamatérgica y gabérgica, centrándonos, esencialmente, en los estudios que se han hecho en el estriado y en la corteza cerebral de la rata.

2.1. DOPAMINA

2.1.1. Neurotransmisión dopaminérgica

La dopamina (DA), considerada en un principio como un simple intermediario de la síntesis de adrenalina y noradrenalina, fue identificada como neurotransmisor en los años 60 (ver Molinoff y Axelrod, 1971). La investigación acerca de la transmisión neural mediada por DA aumentó rápidamente debido, en parte, al descubrimiento de la implicación de la DA en la enfermedad de Parkinson y en la esquizofrenia (ver p. ej. Côté y Crutcher, 1991 y Kandel, 1991).

Introducción

2.1.1.1. Metabolismo de la DA

La DA se sintetiza en el citosol de las neuronas a partir de la tirosina mediante la acción de las enzimas tirosina-hidroxilasa y dopa-decarboxilasa. La enzima limitante en esta ruta de síntesis es la tirosina-hidroxilasa. Esta enzima se encuentra en el citosol de las neuronas catecolaminérgicas, requiere de la presencia de O_2 , Fe^{2+} y el cofactor tetra-hidrobiopterina y es inhibida por su producto (ver las revisiones de Weiner y Molinoff, 1989 y Goldstein, 1995).

La degradación de la DA se lleva a cabo por medio de la acción de dos enzimas: la monoaminoxidasa y la catecol-O-metiltransferasa. La monoaminoxidasa es una enzima intracelular que se encuentra localizada en la cara externa de las mitocondrias y degrada la DA citoplasmática que no está almacenada dentro de las vesículas presinápticas. La catecol-O-metiltransferasa es una enzima principalmente extracelular que, en el Sistema Nervioso, degrada la DA liberada a la hendidura sináptica (Weiner y Molinoff, 1989).

2.1.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación de la DA

La DA sintetizada en el citosol de las neuronas es introducida en las vesículas presinápticas a través de sistemas de transporte acoplados a un gradiente de H^+ que es mantenido por una ATPasa dependiente de Mg^{2+} (Seiden *et al.*, 1993). Sin embargo, no toda la DA neuronal se encuentra dentro de las vesículas: existe una pequeña proporción de DA libre en el citosol.

La DA vesicular es liberada de forma dependiente de Ca^{2+} tras una despolarización de la membrana neuronal. La DA que se encuentra en el citoplasma puede ser liberada de forma independiente de Ca^{2+} mediante la

inversión del sentido del transporte de DA a través de los sistemas transportadores que se encuentran en la membrana de la terminación nerviosa, aunque esta liberación independiente de Ca^{2+} no parece ser fisiológica (Levi y Raiteri, 1993; Seiden *et al.*, 1993).

La inactivación de la DA liberada a la hendidura sináptica se produce por captura a través de sistemas de transporte dependientes de Na^+ y Cl^- o por degradación de la misma mediante la acción de la catecol-O-metiltransferasa (Amara y Kuhar, 1993; Seiden *et al.*, 1993).

2.1.1.3. Receptores dopaminérgicos

Clásicamente, y basándose en estudios farmacológicos, se han descrito dos tipos de receptores para la DA: los receptores D1 y los receptores D2 (Kebabian y Calne, 1979). Ambos son receptores acoplados a proteínas G. La activación de los receptores D1 estimula la adenilato-ciclase y eleva, por tanto, la concentración de AMPc. La activación de los receptores D2, en general, inhibe la adenilato-ciclase, aunque también pueden actuar a través de la apertura de canales de K^+ , el bloqueo de canales de Ca^{2+} y la inhibición de la ruta de los fosfatidil-inosoles (ver Sibley y Momsma, 1992).

Los estudios moleculares han demostrado la existencia de un mayor número de receptores dopaminérgicos (ver p. ej. las revisiones de Sibley y Momsma, 1992 y Civelli, 1995). Hasta la fecha se han descrito seis tipos de receptores dopaminérgicos: D1, D2s, D2l, D3, D4 y D5. A pesar de todo, estos receptores se pueden seguir clasificando en base a los tipos farmacológicos clásicos. Así, los receptores D1 y D5 estimulan la adenilato-ciclase y forman la familia de receptores D1 (se los denomina a veces como D1A y D1B respectivamente). Por otra parte, los receptores D2s, D2l, D3 y D4 inhiben la adenilato-ciclase y forman la familia

de receptores D2 (denominados a veces como D2As, D2A1, D2B y D2C respectivamente).

Farmacológicamente, los receptores D1 y D5 son equivalentes (el SKF-38393 y el fenoldopam actúan como agonistas selectivos en ambos y el SKF-83566 y el SCH-23390 actúan sobre ellos como antagonistas selectivos). La única diferencia conocida actualmente entre ambos tipos de receptores es su localización: ambos son postsinápticos, pero los D1 se localizan en el estriado, el núcleo *accumbens* y el tubérculo olfatorio mientras que los D5 se encuentran en el hipocampo y el hipotálamo (ver Sibley y Momsma, 1992).

En cuanto a la familia de receptores D2, el N-0437 y la bromocriptina actúan como agonistas selectivos en todos ellos; sin embargo, el sulpiride y el YMO-91512 son antagonistas selectivos de los receptores D2 y D3, mientras que la clozapina actúa como antagonista selectivo de los receptores D4. Por otra parte, los D2 se encuentran, fundamentalmente, en el estriado, el núcleo *accumbens* y el tubérculo olfatorio, los D3 en el núcleo *accumbens*, el tubérculo olfatorio y el cerebelo, y los D4 en la corteza frontal, la médula espinal y el mesencéfalo (ver Sibley y Momsma, 1992 y Díaz *et al.*, 1995).

La presencia de receptores D3 en áreas cerebrales que reciben una inervación dopaminérgica pobre sugiere que estos receptores podrían participar en acciones de la DA no mediada por contactos sinápticos (ver Díaz *et al.*, 1995).

En general, los receptores D2 se pueden localizar a nivel tanto pre como post-sináptico. Los receptores D2 presinápticos (autorreceptores) se encuentran en terminaciones

nerviosas, fundamentalmente en las terminaciones dopaminérgicas, y no parecen estar acoplados a proteínas G. Estos receptores presinápticos regulan la síntesis y liberación de DA (se puede consultar una revisión en Roth, 1984). Los receptores D2 postsinápticos sí están acoplados a la adenilato-ciclasa a través de proteínas G de forma que su activación inhibe la adenilato-ciclasa.

2.1.1.4. Vías dopaminérgicas

Las principales vías dopaminérgicas del cerebro de la rata (ver Björklund y Lindvall, 1984) son las que forman los sistemas de proyección mesoestriatal, mesolímbico y mesocortical. Se originan en la sustancia negra y el área ventrotectal del mesencéfalo y proyectan a estriado, áreas límbicas y áreas de la corteza cerebral respectivamente.

Se han descrito otras vías dopaminérgicas (ver Björklund y Lindvall, 1984) que van desde hipotálamo dorsal y posterior hacia médula espinal; desde zona incierta e hipotálamo periventricular a área preóptica e hipotálamo periventricular; desde sustancia gris periacueductal y sustancia gris periventricular del hipotálamo a sustancia gris periacueductal, tálamo medial e hipotálamo medial; y desde núcleos arcuato y periventricular a pituitaria y eminencia media.

Además de estas neuronas de proyección, existen interneuronas dopaminérgicas en bulbo olfatorio y retina.

El más importante de todos estos sistemas dopaminérgicos es el mesoestriatal. De hecho, se ha calculado que el 80% de toda la DA cerebral se encuentra en el estriado (ver Weiner y Molinoff, 1989).

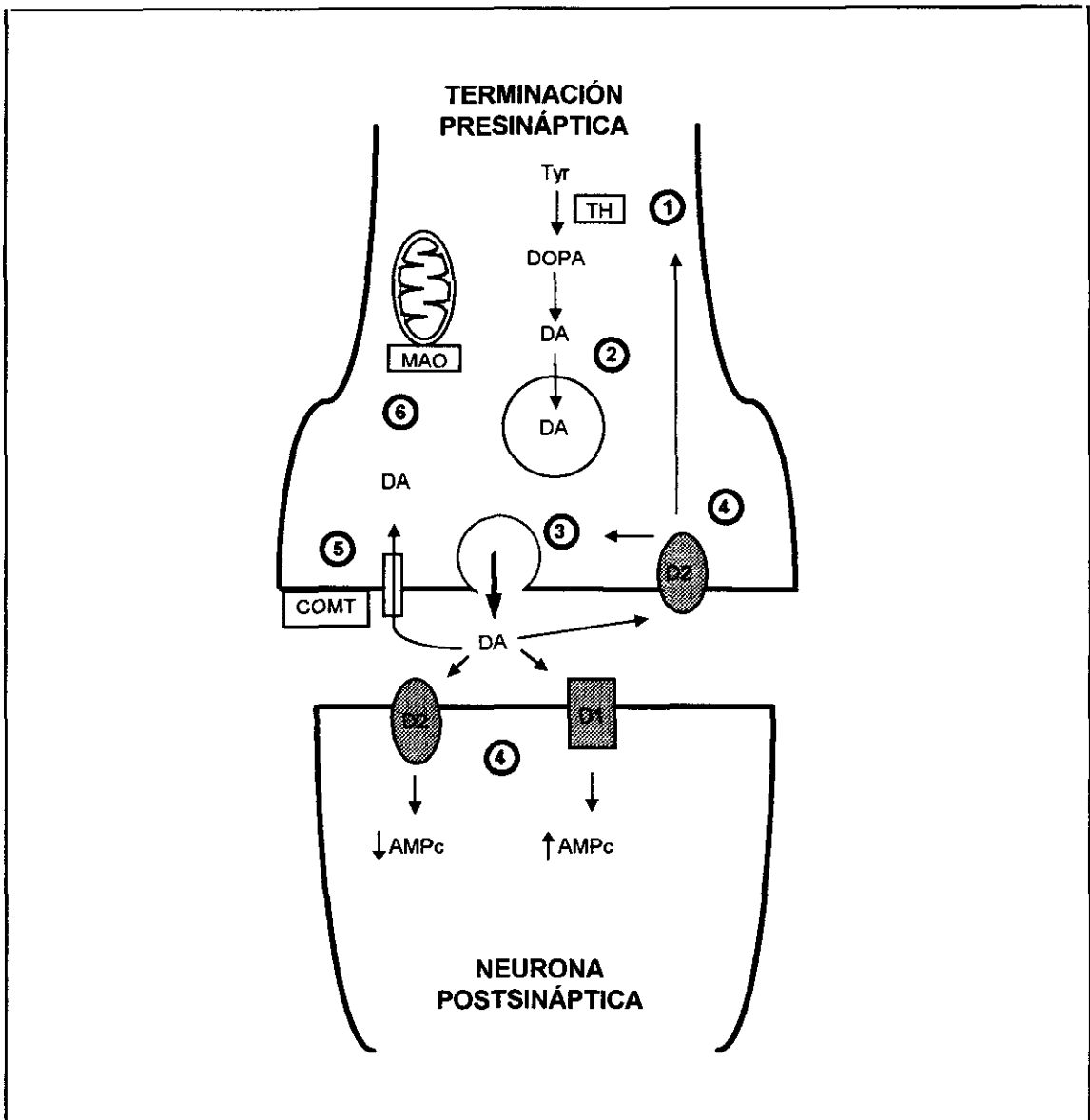


Fig. 1. Esquema de los procesos relacionados con la neurotransmisión dopaminérgica. ① Síntesis de dopamina (DA) a partir de tirosina (Tyr); la tirosina-hidroxilasa (TH) es la enzima reguladora de esta ruta. ② Almacenamiento de DA en vesículas presinápticas. ③ Liberación de DA por exocitosis. ④ La unión de la DA a los receptores D1 produce un aumento de AMPc. La unión de la DA a los receptores D2 postsinápticos produce, en general, una disminución de AMPc. La activación de los receptores D2 presinápticos (autorreceptores) regula la síntesis y liberación de DA. ⑤ La inactivación de la DA se produce por recaptación a través de transportadores y por degradación por la enzima extracelular catecol-O-metiltransferasa (COMT). ⑥ La DA recaptada es degradada por la enzima monoamino oxidasa (MAO).

2.1.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica

Probablemente, la vía mejor estudiada en relación con el envejecimiento cerebral es la proyección dopaminérgica nigro-estriatal. Esto se debe, en gran parte, al descubrimiento de que la enfermedad de Parkinson se produce como consecuencia de la muerte de las neuronas de proyección de la sustancia negra, con la consiguiente disminución del contenido de DA en el estriado.

2.1.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de DA en muestras de tejido cerebral

La concentración de DA en muestras de tejido cerebral es un buen indicador del estado en que se encuentran los procesos de síntesis y degradación de la DA y, por tanto, de la cantidad de DA de que disponen las terminaciones dopaminérgicas. Esta aproximación metodológica ha sido muy utilizada para estudiar el efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica. Los resultados descritos son, sin embargo, contradictorios.

En la rata, algunos autores han descrito una disminución del contenido de DA en el estriado durante el envejecimiento (Joseph *et al.*, 1978; Ponzio *et al.*, 1982; Strong *et al.*, 1982; Giorgi *et al.*, 1987; Stoessl *et al.*, 1989; Marshall y Rosenstein, 1990); sin embargo, otros no han detectado tales cambios (Ponzio *et al.*, 1978; Rose *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1987; Godefroy *et al.*, 1989).

Dado que existen trabajos que, utilizando técnicas, razas de rata y grupos de edad similares, obtienen resultados opuestos y, a la inversa, con técnicas, razas y edades diferentes, varios trabajos obtienen resultados similares, no se puede apelar a estos factores como causantes de la disparidad de estos resultados. Por ello, estos datos no nos permiten, por sí

solos, dilucidar el efecto que el envejecimiento tiene sobre la cantidad de DA en el estriado.

Por otra parte, se ha descrito una disminución de la actividad de la enzima tirosina-hidroxilasa en el estriado de la rata durante el envejecimiento (Algeri *et al.*, 1977; Ponzio *et al.*, 1982) y una reducción similar de la tasa de síntesis de DA (Ponzio *et al.*, 1978; Watanabe *et al.*, 1987; Marshall y Rosenstein, 1990). También se ha descrito una mayor actividad de la enzima monoamino-oxidasa-B en el estriado de ratas viejas (Strolin Benedetti y Dostert, 1989). Estos datos sugieren que existe una disminución real de DA en el estriado durante el envejecimiento. Además, esta hipótesis se ve apoyada por la disminución del número de neuronas durante el envejecimiento descrita en la sustancia negra (donde se encuentran los cuerpos celulares de la terminaciones dopaminérgicas del estriado) (Sabel y Stein, 1981).

En el humano, también se ha descrito una pérdida de neuronas en la sustancia negra, (Coleman y Flood, 1987) y una disminución de la actividad de la enzima tirosina-hidroxilasa (McGeer *et al.*, 1971). Sin embargo, cuando se estudia el contenido de DA en el estriado los resultados vuelven a ser contradictorios, describiéndose tanto reducciones del contenido de DA durante el envejecimiento (Adolfsson *et al.*, 1979) como mantenimiento del contenido de DA a lo largo de la edad (Robinson *et al.*, 1977; MacKay *et al.*, 1978; se puede consultar la revisión de Katzman y Terry, 1992).

2.1.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la liberación de DA

Hay pocos trabajos que hayan estudiado las concentraciones cerebrales de DA en condiciones basales. En el estriado, varios trabajos, utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*, no han detectado cambios significativos de las concentraciones extracelulares de DA con la

Introducción

edad (Dluzen *et al.*, 1991; Venero *et al.*, 1991; Kametani *et al.*, 1995).

La liberación de DA inducida por altas concentraciones de K^+ se ha utilizado como modelo para estudiar la capacidad de las terminaciones dopaminérgicas para liberar DA. Durante el envejecimiento, se ha descrito que la liberación *in vitro* (Thompson *et al.*, 1981; Joseph *et al.*, 1988) e *in vivo* (Kametani *et al.*, 1995) de DA inducida por K^+ se mantiene sin cambios en el estriado de animales viejos. Otros autores, sin embargo, han descrito disminuciones con la edad de la liberación de DA inducida por K^+ (Rose *et al.*, 1986; Dluzen *et al.*, 1991; Friedemann y Gerhardt, 1992; Dobrev *et al.*, 1995). Por otra parte, Rose *et al.* (1986), utilizando técnicas *in vivo* han descrito una disminución de la liberación de DA tras estimulación con K^+ heterogénea en la muestra de animales de experimentación utilizados. Estos autores describen dos grupos diferentes de animales viejos: uno de ellos no muestra cambios en cuanto a la liberación estimulada de DA, mientras que el otro muestra una disminución de ésta, lo cual pone de manifiesto una vez más la variabilidad entre individuos del proceso de envejecimiento cerebral.

De forma similar a lo que ocurre con la concentración de DA en el tejido cerebral, la existencia de varios trabajos de diferente metodología en uno y otro grupo de resultados descartan la posibilidad de imputar a factores metodológicos la existencia de datos contradictorios. Ello nos impide determinar de forma clara el efecto del envejecimiento sobre la liberación de DA.

2.1.2.3. Efectos del envejecimiento sobre los sistemas transportadores de DA

La aplicación de anfetamina ha sido utilizada como método para estudiar la capacidad de las terminaciones dopaminérgicas de liberar DA. Sin embargo, la anfetamina

produce una liberación de DA citoplasmática que es independiente de Ca^{2+} , por lo que estos estudios nos informan más del estado de los sistemas de transporte de DA y de la capacidad de síntesis de DA que de los mecanismos de liberación vesicular de DA.

En el estriado, varios trabajos han descrito una menor liberación de DA tras la administración de anfetamina en animales viejos (Dluzen *et al.*, 1991; Kametani *et al.*, 1995), aunque también existe un trabajo que no detecta tales cambios (Thompson *et al.*, 1981).

En un extenso trabajo utilizando técnicas *in vitro*, Dobrev *et al.* (1995) han descrito varias modificaciones en la liberación de DA en animales viejos. Así, la aplicación de veratridina produce una liberación de DA mayor en animales viejos que en animales jóvenes. Esta liberación de DA no se vio afectada en animales jóvenes por la tratamiento previo de reserpina (lo que indica que tal liberación no es vesicular) pero sí en animales viejos. Por otra parte, la liberación de DA inducida por K^+ fue menor en animales viejos, sin embargo, la ouabaina (inhibidor de la bomba $Na^+-K^+-ATPasa$) disminuyó esta liberación de DA en los animales jóvenes (como cabía esperar) pero aumentó la obtenida en animales viejos. Estos resultados han hecho sugerir a los autores la hipótesis de que durante el envejecimiento podría existir una disminución de la liberación vesicular de DA (dependiente de Ca^{2+}), acompañada de un aumento de la liberación citosólica de DA (independiente de Ca^{2+}) (Dobrev *et al.*, 1995). Esta hipótesis, sin embargo, no estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por otros en los que la anfetamina induce una liberación de DA similar o menor en animales viejos (ver más arriba).

Por otra parte, los trabajos que han estudiado directamente el número de transportadores de DA y su afinidad por la DA no han

detectado cambio alguno a lo largo de la edad en el estriado de la rata (Thompson *et al.*, 1981; Strong *et al.*, 1984; Marshall y Alter, 1986).

En el humano, estudios realizados *in vivo* han descrito una disminución del número de transportadores de DA durante el envejecimiento en el cuerpo estriado (Volkow *et al.*, 1994; Van Dyck *et al.* 1995).

2.1.2.4. Efectos del envejecimiento sobre los receptores dopaminérgicos

Uno de los hechos mejor establecidos en relación con el efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica es la disminución de la densidad de receptores dopaminérgicos D2 en el estriado. Este hecho se ha observado tanto en animales de experimentación como en humanos, independientemente de las técnicas utilizadas (ver p. ej. Joyce *et al.*, 1986; Hyttel, 1987; Morgan *et al.*, 1987; Han *et al.*, 1989; Morelli *et al.*, 1990; Rinne *et al.*, 1990; Murray y Waddington, 1991; Antononi *et al.*, 1993 y la revisión de Joseph *et al.*, 1990).

En relación con los receptores dopaminérgicos D1, existen datos controvertidos (se puede consultar una discusión de esta controversia en Joseph *et al.*, 1990). Así, algunos autores han descrito una disminución del número de receptores D1 durante el envejecimiento paralela a la que ocurre con los receptores D2 (p. ej. Giorgi *et al.*, 1987; Hyttel, 1987; Morelli *et al.*, 1990); sin embargo, otros autores describen que el número de receptores D1 no cambia durante el envejecimiento (p. ej. Rinne, 1987; O'Boyle y Waddington, 1984 y Murray y Waddington, 1991).

En todo caso, se ha sugerido que la disminución del número de receptores dopaminérgicos durante el envejecimiento se podría producir como consecuencia tanto de la muerte de neuronas que expresan estos

receptores como de la disminución de la síntesis de receptores dopaminérgicos en las neuronas supervivientes (Mesco *et al.*, 1991; Giorgi *et al.*, 1992; ver la revisión de Joseph *et al.*, 1990).

2.1.2.5. Acerca del efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica

Todos los datos aquí revisados se refieren al estado de la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado, no sólo por ser el estriado el área cerebral donde se concentra la mayor parte de la DA, sino, sobre todo, por la ausencia de trabajos en otras áreas del cerebro.

De los datos revisados podría sugerirse que el envejecimiento produce una alteración de la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado fundamentalmente a nivel postsináptico, produciendo una disminución del número de receptores de DA. A nivel presináptico, la disminución del número de neuronas descrita en la sustancia negra parece tener como consecuencia una disminución de la capacidad de liberar DA por parte de las terminaciones dopaminérgicas del estriado, probablemente por una disminución en la síntesis de DA, aunque este hallazgo no está bien confirmado.

Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado de la rata

- Disminución de la síntesis de DA
 - Disminución de la concentración de DA (?)
 - Conservación de la capacidad de liberar DA en condiciones basales
 - Disminución de la capacidad de liberar DA tras estimulación con K⁺ (?)
 - Conservación del número de transportadores de DA y de su afinidad por la DA
 - Disminución del número de receptores D2
 - Disminución del número de receptores D1 (?)
-

Introducción

Se ha sugerido que la alteración de la neurotransmisión dopaminérgica que se produce durante el envejecimiento está implicada en las alteraciones motoras y cognitivas que se observan en los individuos viejos (ver p. ej. Murray y Waddington, 1991 y Arnsten, 1993).

2.2. ÁCIDO GLUTÁMICO

2.2.1. Neurotransmisión glutamatérgica

El ácido glutámico (GLU) es el neurotransmisor excitador más abundante en el Sistema Nervioso de los mamíferos. Sus efectos excitadores fueron descritos en los años 50, al observar que su aplicación tópica sobre la corteza cerebral producía actividad convulsiva (Hayashi, 1952) y que su aplicación iontoforética producía despolarización de neuronas e incremento de la frecuencia de potenciales de acción (Curtis *et al.*, 1959). Actualmente, se considera bien establecido que el GLU cumple el papel de neurotransmisor en la mayoría de las sinapsis excitadoras rápidas del Sistema Nervioso Central (se pueden consultar las revisiones de Fagg y Foster, 1983; Fonnum, 1984; Cotman *et al.*, 1987; Nicholls, 1993; Orrego y Villanueva, 1993).

2.2.1.1. Metabolismo del GLU

El GLU puede ser sintetizado en el Sistema Nervioso a través de multitud de rutas (a partir de glutamina -GLN-, α -cetoglutarato, proteínas, arginina, ornitina o prolina) siendo sus principales precursores la glucosa y la GLN (Fonnum, 1993). Actualmente se considera que la síntesis de GLU en el Sistema Nervioso ocurre, principalmente a partir de la GLN por acción de la enzima glutaminasa (Bradford *et al.*, 1978; Fonnum, 1993). También existe una ruta de síntesis a partir del α -cetoglutarato catalizada por la aspartato aminotransferasa (Bradford 1988; McGeer y McGeer, 1989; Fonnum, 1993).

La glutaminasa es una enzima mitocondrial que se encuentra mayoritariamente en las terminaciones nerviosas de las neuronas glutamatérgicas, aunque se puede localizar en otros tipos celulares (Fonnum, 1993). La enzima glutaminasa está regulada principalmente mediante inhibición por su producto (Bradford, 1978); puede activarse por fosfato y Ca^{2+} , es decir, por el incremento de la actividad en la terminación nerviosa, y puede ser inhibida por NH_4^+ y H^+ (Fonnum, 1993).

El catabolismo del GLU se realiza principalmente por oxidación a través del ciclo de Krebs o por conversión del GLU en GLN mediante la enzima glutamina sintetasa (Fonnum, 1993). La glutamina sintetasa se encuentra localizada casi exclusivamente en la astrogliá (Martínez-Hernández, 1977), si bien no se puede excluir una pequeña actividad de esta enzima en neuronas (Fonnum, 1993).

El metabolismo del GLU en el Sistema Nervioso se encuentra, por tanto, separado en dos compartimentos celulares: por un lado las terminaciones nerviosas y por el otro las células gliales. Así, el GLU es sintetizado en las terminaciones nerviosas y, tras su liberación al espacio sináptico, es captado en su mayoría por las células gliales, donde es convertido en GLN mediante la enzima glutamina sintetasa. Una vez sintetizada, la GLN difunde al espacio extracelular, de donde es captada por las neuronas glutamatérgicas a través de transportadores de baja afinidad, utilizándose para la síntesis de GLU (Fonnum, 1993).

2.2.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación del GLU

El GLU sintetizado en la terminación nerviosa es almacenado en vesículas sinápticas. El mecanismo de transporte vesicular de GLU es independiente de Na^+ y está acoplado a un gradiente de H^+ que es generado por una Mg^{2+} -

ATPasa dirigida hacia el interior de la vesícula (Naito y Ueda, 1985; Nicholls, 1993). También existe un almacén de GLU en citoplasma.

La liberación sináptica Ca^{2+} -dependiente de GLU tras estimulación química o eléctrica se ha demostrado *in vitro* (Fonnum, 1984; Nicholls, 1989). Estudios en sinaptosomas han demostrado que esta liberación se produce por exocitosis y no por salida directa desde el citoplasma (Nicholls, 1989).

La inactivación del GLU liberado al espacio sináptico se produce mediante la introducción de éste en las terminaciones nerviosas y en los astrocitos circundantes a través de sistemas de captación de alta afinidad y dependientes del gradiente de Na^+ y K^+ (Nicholls, 1993). De estos dos componentes celulares, el glial es el que capta la mayoría del GLU liberado (Rothstein *et al.*, 1996): se ha calculado que, en el estriado, el 80% del GLU es captado por los transportadores localizados en las células gliales (Rothstein *et al.*, 1996).

Hasta la fecha se han clonado tres transportadores de membrana de alta afinidad para el GLU (ver la revisión de Attwell y Mobbs, 1994). En todo caso, los tres parecen tener el mismo mecanismo de acción: la entrada de cada molécula de GLU se acompaña de la entrada de 2 moléculas de Na^+ y de la salida de 1 molécula de K^+ y otra de OH^- o de HCO_3^- .

El transporte de GLU puede invertirse cuando la concentración extracelular de K^+ es elevada o cuando se disipa el gradiente de Na^+ (p. ej. con veratridina), produciéndose una liberación de GLU que es independiente de Ca^{2+} . Este tipo de liberación se ha demostrado *in vitro* (Nicholls, 1989; Attwell *et al.*, 1993). *In vivo*, experimentos realizados en nuestro laboratorio han mostrado la liberación de GLU a través de transportador (del Arco *et al.*, y Segovia *et al.*, datos no publicados).

Actualmente se discute que la liberación de GLU a través de su transportador pueda ser un componente importante de la liberación fisiológica de GLU, aunque sí parece claro que el aumento de la concentración extracelular de GLU observado en determinadas condiciones patológicas (p. ej. en isquemia), podría explicarse también por la liberación de GLU a través de estos sistemas transportadores (Nicholls y Attwell, 1990; Levi y Raiteri, 1993; Nicholls, 1993).

2.2.1.3. Receptores glutamatergicos

Los estudios farmacológicos y moleculares han permitido demostrar la existencia en el Sistema Nervioso de receptores glutamatergicos de dos clases: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos.

Los receptores glutamatergicos ionotrópicos son canales iónicos. Farmacológicamente se han descrito tres tipos de receptores ionotrópicos para el GLU en función de su diferente afinidad por sustancias: los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), y los receptores kainato (KA) (Farooqui y Horrocks, 1991; Nakanishi, 1992; Sprengel y Seeburg, 1993).

El receptor NMDA es un canal iónico selectivo para el Ca^{2+} regulado por múltiples sitios de unión. Se han descrito sitios de unión específicos para el GLU o sus agonistas; para glicina; para cationes, en el interior del canal, donde el Mg^{2+} puede unirse y bloquear el flujo de iones; para penciclidinas; para poliaminas; para el Zn^{2+} (distinto del de Mg^{2+}); para H^+ y un sitio redox (Farooqui y Horrocks, 1991; Nakanishi, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994).

Los receptores NMDA poseen una elevada permeabilidad para el Ca^{2+} , pueden activarse de forma prolongada y pueden ser bloqueados por Mg^{2+} dependiendo del voltaje de la membrana (Nakanishi, 1992; Sprengel y Seeburg, 1993).

Introducción

Sus propiedades indican que el receptor NMDA puede actuar como un detector de coincidencia molecular: su activación depende de la existencia simultánea de actividad presináptica (liberación de GLU) y postsináptica (despolarización). Debido a esto, el receptor NMDA ha sido implicado en procesos tales como aprendizaje, memoria y coordinación motora. Por otra parte, esas mismas propiedades también sugieren que el receptor NMDA podría participar en la muerte neuronal inducida por la presencia de altas concentraciones de GLU en el espacio extracelular (Farooqui y Horrocks, 1991; Sprengel y Seeburg, 1993).

Los receptores AMPA son canales iónicos independientes de voltaje, de cinética rápida y con permeabilidad selectiva para cationes monovalentes (Na^+ , K^+). Se considera que el receptor AMPA es el responsable de la transmisión excitadora rápida mediada por GLU y de la activación del receptor NMDA por desbloqueo del canal iónico como consecuencia de la despolarización. Por esto último se comprende que su distribución en el Sistema Nervioso Central sea muy similar a la del receptor NMDA: ambos se encuentran en alta concentración en la corteza cerebral, el hipocampo, el estriado y el tálamo (Farooqui y Horrocks, 1991; Sprengel y Seeburg, 1993).

Los receptores KA presentan, como los receptores AMPA, una alta permeabilidad para cationes monovalentes (Na^+ , K^+) (Farooqui y Horrocks, 1991; Sprengel y Seeburg, 1993). En realidad, varios estudios han mostrado que el KA puede actuar tanto sobre receptores KA como sobre receptores AMPA. El papel fisiológico de estos receptores KA es incierto. Se ha sugerido su participación en la transmisión excitadora rápida. Su localización es complementaria a la de los receptores NMDA y AMPA, si bien parecen estar presentes en todos los circuitos neuronales del

Sistema Nervioso Central (Nakanishi, 1992; Sprengel y Seeburg, 1993).

Los receptores glutamatergicos metabotrópicos, por su parte, actúan acoplados a distintos efectores celulares a través de proteínas G. Se han clonado hasta 8 tipos diferentes de estos receptores (mGluR1-8) a los que se ha agrupado en tres familias en función de la afinidad por diferentes agonistas y de los segundos mensajeros ligados a su activación (Nakanishi, 1992; Schoepp y Conn, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994; Nakanishi, 1994; Pin y Duvoisin, 1995):

- los receptores mGluR1 y 5 responden mejor al quisqualato y su estimulación aumenta la síntesis de inosítoles trifosfato y, por tanto, la concentración intracelular de Ca^{2+} por movilización de las reservas internas de este catión; se ha descrito también el aumento de los niveles de AMPc y de ácido araquidónico por activación del receptor mGluR1;
- los receptores mGluR2 y 3 responden mejor al trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato y su estimulación inhibe la formación de AMPc;
- los receptores mGluR4, 6 y 7 responden mejor al 2-amino-4-fosfonobutirato y su estimulación también inhibe la síntesis de AMPc.

Los receptores mGluR8 son de difícil clasificación: algunos autores los incluyen dentro del grupo de los receptores mGluR2-3 (Nakanishi, 1994) y otros dentro del grupo de los receptores mGluR4-6-7 (Pin y Duvoisin, 1995).

En general, se ha asignado a los receptores metabotrópicos un papel predominantemente modulador de la neurotransmisión (Baskys, 1992; Nakanishi, 1992). La activación de estos receptores puede producir despolarización

(Schoepp y Conn, 1993); sin embargo, en función de los distintos efectores celulares a los que estén acoplados, sus efectos pueden ser tanto excitadores como inhibidores. De hecho se ha descrito un aumento de las corrientes de Cl^- y de K^+ tras activación de receptores metabotrópicos que provoca una reducción de la excitabilidad neuronal (Schoepp y Conn, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994).

La activación de receptores glutamatergicos metabotrópicos puede inhibir la transmisión glutamatergica. Este efecto está mediado, probablemente, por autorreceptores presinápticos del tipo mGluR4 (que fueron considerados hace años como un tipo diferente de receptores glutamatergicos: los receptores 2-amino-4-fosfonobutirato -AP4-), mGluR2 y mGluR3 (Nakanishi, 1992; Schoepp y Conn, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994).

2.2.1.4. Vías glutamatergicas

Las neuronas glutamatergicas están distribuidas ampliamente en todo el Sistema Nervioso Central, principalmente en el telencéfalo, donde la mayoría de las

proyecciones corticales contienen GLU (ver las revisiones de Fagg y Foster, 1983 y Cotman *et al.*, 1987). Las vías glutamatergicas son funcionalmente heterogéneas, debido a la diferente distribución de los receptores glutamatergicos. Por ejemplo, las vías que usan receptores NMDA están vinculadas a procesos de plasticidad sináptica e integración sensorial, mientras que las que usan receptores AMPA o KA lo están a la transmisión excitadora rápida (Cotman *et al.*, 1987).

Las vías glutamatergicas mejor conocidas son las proyecciones córtico-fugales que, desde corteza, llegan a estriado, tálamo y núcleos del tronco cerebral (ver la revisión de Cotman *et al.*, 1987).

También han sido descritas vías glutamatergicas tálamo-corticales y córtico-corticales, éstas últimas fundamentalmente en el hipocampo. Son glutamatergicas, por ejemplo, la vía entorrino-cortical (vía perforante), las fibras comisurales, las fibras musgosas y las colaterales de Schaffer (Fagg y Foster, 1983; Fonnum, 1984; Cotman *et al.*, 1987).

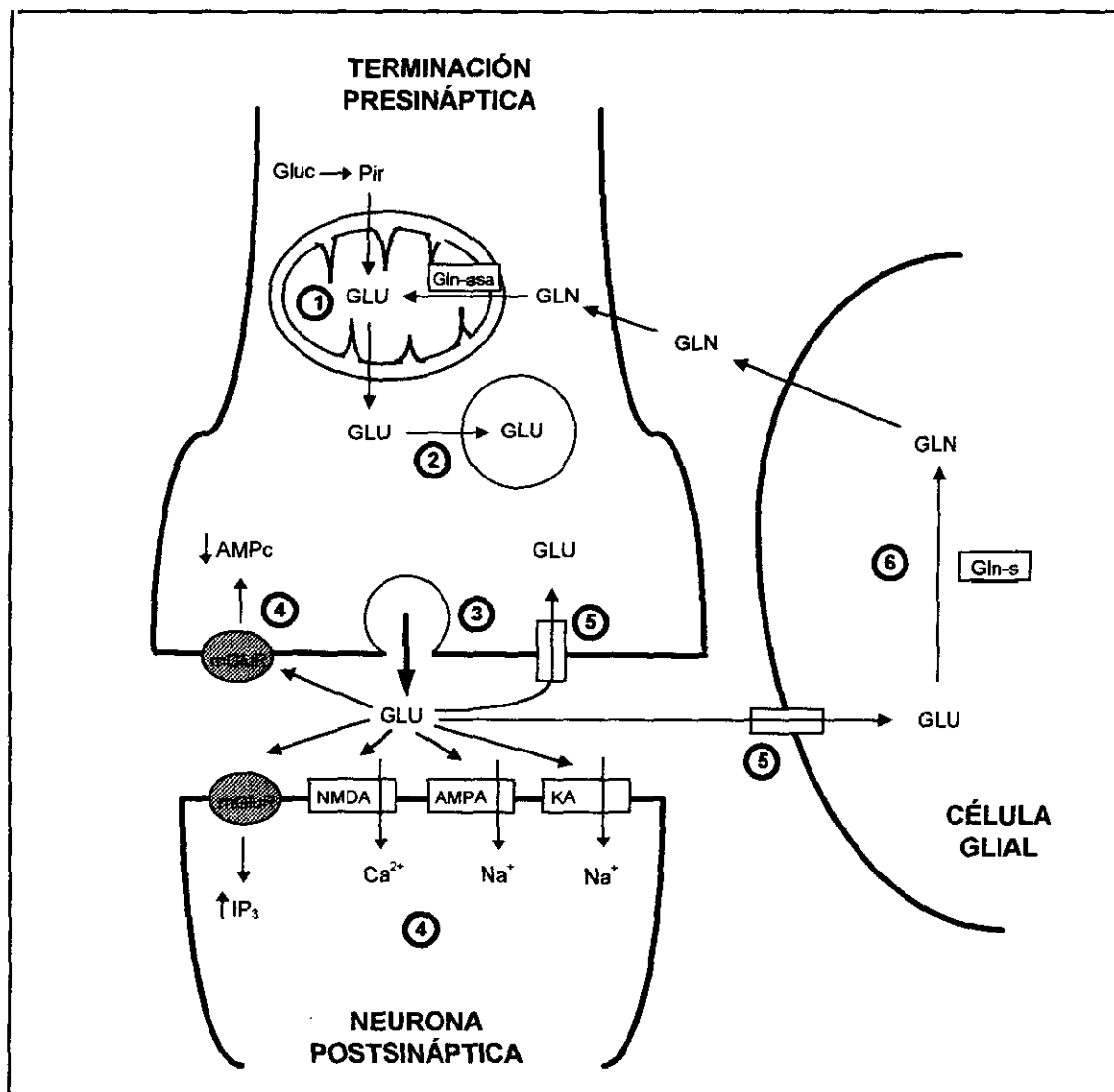


Fig. 2. Esquema de los procesos relacionados con la transmisión glutamatergica. ① Síntesis de ácido glutámico (GLU) a partir de glutamina (GLN), reacción catalizada por la glutaminasa (Gln-asa). El GLU también puede ser sintetizado a partir de glucosa (Gluc) (Pir: piruvato). ② Almacenamiento de GLU en vesículas presinápticas. ③ Liberación de GLU por exocitosis. ④ La unión del GLU a los receptores AMPA y KA produce la entrada de Na^+ en la neurona postsináptica. La unión del GLU a los receptores NMDA produce la entrada de Ca^{2+} en la neurona postsináptica. La activación de los receptores metabotrópicos (mGlu.R) postsinápticos produce un aumento del inositol trifosfato (IP_3). La activación de los mGlu-R presinápticos produce una disminución de AMPc. ⑤ La inactivación del GLU se produce por recaptación a través de transportadores situados en las terminaciones presinápticas y en las células gliales. ⑥ El GLU recaptado por las células gliales es transformado en GLN a través de la acción de la glutamina sintetasa (Gln-s). La GLN glial es liberada al espacio extracelular y captado por las terminaciones presinápticas y utilizada para sintetizar GLU.

2.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica

2.2.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de GLU en muestras de tejido cerebral

Los primeros estudios sobre el efecto del envejecimiento en la neurotransmisión glutamatérgica se hicieron analizando el contenido de GLU en muestras de tejido cerebral (en lo que sigue acerca del efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica, se puede consultar Porras y Mora, 1996 o la revisión de Porras y Mora, de próxima aparición).

En la corteza cerebral, cuando es analizada sin distinguir entre áreas, la mayoría de los estudios han mostrado un menor contenido de GLU en animales viejos en comparación con animales adultos jóvenes (Davis y Himwich, 1975; Strolin Benedetti *et al.*, 1990, 1991; Saransaari y Oja, 1995).

Cuando la corteza cerebral es analizada separándola en áreas diferentes de acuerdo a su estructura, se observa que el efecto del envejecimiento sobre el contenido de GLU es diferente en cada una de ellas. Por ejemplo, algunos trabajos describen cantidades menores de GLU en la corteza frontal de animales viejos en comparación con animales jóvenes (Dawson *et al.*, 1989; Wallace y Dawson, 1990) mientras que otros no detectan diferencias en el contenido de GLU en cortezas parietal o temporal entre animales viejos y jóvenes (Fornieles *et al.*, 1986; Banay-Schwartz *et al.*, 1989). Incluso dentro de la corteza frontal se ha descrito una disminución de GLU con el envejecimiento en la corteza prefrontal medial pero no en las subdivisiones sulcal y dorsal de la corteza prefrontal (Fornieles *et al.*, 1986).

En el estriado los resultados descritos en la bibliografía son contradictorios: se han descrito disminuciones (Strolin Benedetti *et al.*, 1990,

1991), ausencia de cambios (Dawson *et al.*, 1989; Wallace y Dawson, 1990; Saransaari y Oja, 1995) y aumentos (Donzanti y Ung, 1990) de la concentración de GLU durante el envejecimiento.

En el hipocampo, sí parece existir una concentración de GLU menor en animales viejos en comparación con animales jóvenes (Banay-Schwartz *et al.*, 1989; Strolin Benedetti *et al.* 1990, 1991; Saransaari y Oja, 1995). Existe un trabajo en el que no se detectan cambios en la concentración de GLU durante el envejecimiento en el hipocampo (Dawson y Wallace, 1992). Sin embargo, este trabajo está hecho con ratas de raza Long-Evans cuya longevidad es mayor que las de raza Wistar y Fisher-344 (ver Coleman y Flood, 1987), por lo que es posible que los cambios debidos al envejecimiento se detecten en estos animales a edades más avanzadas.

En otras estructuras cerebrales, los resultados obtenidos al cuantificar la concentración de GLU durante el envejecimiento son contradictorios. Por ejemplo, en el núcleo *accumbens* se han descrito ausencia de cambios (Donzanti y Ung, 1990) o disminuciones del contenido de GLU (Strolin Benedetti *et al.*, 1990, 1991) y en la sustancia negra se han descrito aumentos (Donzanti y Ung, 1990), ausencia de cambios (Banay-Schwartz *et al.*, 1989) y disminuciones (Strolin Benedetti *et al.*, 1990, 1991) del contenido de GLU.

Las disminuciones de la concentración de GLU en la corteza cerebral, específicamente en la corteza frontal y en el hipocampo durante el envejecimiento parecen bien establecidas. Además, concuerdan con los resultados de los trabajos que analizan el número de neuronas a lo largo del envejecimiento. De hecho se ha descrito muerte de neuronas durante el envejecimiento en la corteza cerebral (Knox, 1982; Heumann y Leuba, 1983; Peters *et al.*, 1987), específicamente en la corteza frontal

Introducción

(Mufson y Stein, 1980), y en el hipocampo (Brizzee y Ordry, 1979; Landfield *et al.*, 1981). En estas estructuras, la mayoría de las neuronas son glutamatérgicas, por lo que la disminución de la concentración de GLU puede ser consecuencia de la muerte neuronal que ocurre durante el envejecimiento.

El análisis de la concentración de GLU en muestras de tejido, sin embargo, no es un buen indicador del estado de la neurotransmisión glutamatérgica, ya que el GLU es un aminoácido que forma parte de proteínas y que interviene en multitud de rutas metabólicas. Así, una alteración en la concentración tisular de GLU podría reflejar cambios en rutas metabólicas en las que interviene el GLU pero que no están relacionadas con la neurotransmisión. Para estudiar el estado de la neurotransmisión glutamatérgica con el envejecimiento es necesario estudiar parámetros más directamente relacionados con la función neurotransmisora del GLU: por ejemplo, la concentración extracelular de GLU, la liberación de GLU inducida por agentes despolarizantes y los transportadores y receptores de GLU.

2.2.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la liberación de GLU

En la corteza cerebral, la mayoría de los estudios han demostrado que no existen cambios a lo largo de la edad en la liberación de GLU en condiciones basales. Esta ausencia de cambios durante el envejecimiento se ha descrito tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in vivo* independientemente de la especie utilizada (ratas y ratones), del área cerebral estudiada (cortezas frontal, parietal y occipital) y de la raza de animal utilizada (ratas Wistar, Long-Evans y Fisher-344) (Dawson *et al.*, 1989; Cobo *et al.*, 1992; Dawson y Wallace, 1992; Cobo *et al.*, 1993; Porrás *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1994; Sánchez-Prieto *et al.*, 1994; Saransaari y Oja, 1994, 1995)

En la corteza cerebral, la liberación de GLU inducida por agentes despolarizantes tales como K^+ o 4-aminopiridina, tampoco parece cambiar durante el envejecimiento (Dawson *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1994; Sánchez-Prieto *et al.*, 1994; Saransaari y Oja, 1994), aunque existe un trabajo que describe que la liberación de GLU inducida por K^+ es mayor en ratones viejos (Saransaari y Oja, 1995). Sin embargo, cuando se han analizado áreas determinadas de la corteza se han encontrado algunos cambios. Por ejemplo, en la corteza temporal se ha descrito una liberación de GLU inducida por K^+ mayor en animales viejos que en animales jóvenes (Meldrum *et al.*, 1992). En la corteza prefrontal se ha descrito una disminución de la sensibilidad al estímulo eléctrico en animales viejos (Cobo *et al.*, 1993).

En el estriado, la mayoría de los estudios muestran que la concentración de GLU en condiciones basales (Sánchez-Prieto *et al.*, 1994; Saransaari y Oja, 1995) o tras estimulación (Freeman y Gibson, 1987; Sánchez-Prieto *et al.*, 1994; Donzanti *et al.*, 1993; Saransaari y Oja, 1995) no cambia durante el envejecimiento. Sin embargo, existe una publicación que describe una concentración basal de GLU mayor en animales viejos (Freeman y Gibson, 1987). Es posible que las diferencias en estos resultados se deban a que los cambios causados por el envejecimiento se produzcan en ciertas regiones del estriado pero no en otras. En este sentido, se ha descrito un aumento de la concentración basal de GLU durante el envejecimiento en el estriado lateral pero no en el estriado medial de la rata (Donzanti *et al.*, 1993).

En otras áreas cerebrales también se ha estudiado la liberación de GLU con el envejecimiento. Por ejemplo, en el hipocampo se ha descrito una concentración extracelular de GLU en condiciones basales mayor en animales viejos que en animales jóvenes

(utilizando ratones y ratas) (Freeman y Gibson, 1987; Meldrum *et al.*, 1992), aunque Saransaari y Oja (1995) describen una menor concentración de GLU en ratones viejos. También son controvertidos los resultados obtenidos cuando se induce la liberación de GLU por K^+ : algunos autores muestran que es mayor en animales viejos (Meldrum *et al.*, 1992; Saransaari y Oja, 1995), pero otros autores no detectan tales cambios (Freeman y Gibson, 1987). Todos estos estudios se han hecho con métodos *in vitro*. Hasta la fecha no existen trabajos publicados sobre la liberación *in vivo* de GLU en el hipocampo durante el envejecimiento.

2.2.2.3. Efectos del envejecimiento sobre los sistemas transportadores de GLU

Los trabajos que estudian la capacidad de recaptar GLU por parte de las neuronas y las células gliales en relación con el proceso de envejecimiento ofrecen resultados contradictorios.

En la corteza cerebral y en el estriado se han descrito tanto disminuciones (Wheeler, 1980; Price *et al.*, 1981; Wheeler y Ondo, 1986; Najlerahim *et al.*, 1990; Saransaari y Oja, 1995) como aumentos (Strong *et al.*, 1984) o ausencia de cambios (Dawson *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1994) de la capacidad de recaptación de GLU durante el envejecimiento. Las diferencias entre estos resultados podrían deberse a que existan disminuciones reales del número de transportadores de GLU compensadas por un aumento de la afinidad de estos transportadores, tal y como se ha sugerido recientemente (Saransaari y Oja, 1995). Por otra parte, todos estos trabajos están hechos utilizando métodos *in vitro*, sobre todo preparaciones de sinaptosomas (terminaciones nerviosas), que no incluyen células gliales. Sin embargo, el GLU liberado al espacio sináptico es captado fundamentalmente por las células gliales (Rothstein *et al.*, 1996). Por tanto, los

cambios descritos en algunos de estos trabajos no son expresión fiel de lo que ocurre en los mecanismos de recaptación del GLU. De hecho, un cambio en la capacidad de recaptación de GLU por parte de las terminaciones nerviosas podría ser compensado por cambios en sentido contrario en el componente glial, por ejemplo con el aumento del número o de la capacidad funcional de los astrocitos. De hecho, algunos trabajos han descrito tales cambios en la glía durante el envejecimiento (Terry, 1986; Vázquez *et al.*, 1992). Esta posibilidad se ve apoyada por los resultados obtenidos utilizando cortes de tejido cerebral, que incluyen tanto neuronas como células gliales, y que han descrito el mantenimiento de la capacidad de recaptación de GLU durante el envejecimiento (Dawson *et al.*, 1989).

Es interesante subrayar que todos los trabajos que han estudiado la capacidad de recaptación de GLU en el hipocampo han demostrado también el mantenimiento de estos sistemas durante el envejecimiento (Gilad *et al.*, 1990; Najlerahim *et al.*, 1990; Palmer *et al.*, 1994).

2.2.2.4. Efectos del envejecimiento sobre los receptores glutamatérgicos

Uno de los resultados mejor establecidos en relación con el estado de la neurotransmisión glutamatérgica durante el envejecimiento es la disminución de receptores glutamatérgicos NMDA. Esta disminución se ha descrito en la mayoría de las áreas corticales, en el hipocampo y en el estriado (Peterson y Cotman, 1989; Miyoshi *et al.*, 1991; Tamaru *et al.*, 1991; Wenk *et al.*, 1991; Cohen y Müller, 1992; Cimino *et al.*, 1993; Magnusson y Cotman, 1993a, 1993b; Castorina *et al.*, 1994; Serra *et al.*, 1994). Estos resultados se han repetido independientemente de la especie animal y de la raza estudiadas (ratas Wistar y

Introducción

Fisher-344; ratones BALB/c, C57B1 y NMRI), así como de la técnica utilizada.

Junto a la disminución de la densidad de receptores NMDA se han descrito otros cambios en este receptor durante el envejecimiento. Por ejemplo, se ha descrito una disminución de la respuesta postsináptica tras la estimulación del receptor NMDA (Baskys *et al.*, 1990; Gonzales *et al.*, 1991; pero ver también Serra *et al.*, 1994), aunque también un aumento de la afinidad del receptor NMDA por el GLU (Cohen y Müller, 1992). Así mismo, se han descrito cambios en la influencia que tienen los sitios de modulación del receptor NMDA sobre la actividad de este receptor (Miyoshi *et al.*, 1990; Piggott *et al.*, 1992).

El número de receptores glutamatérgicos AMPA parece experimentar también disminuciones con el envejecimiento, sin embargo, los resultados con este receptor no son tan consistentes como los obtenidos con el receptor NMDA. Así, se han descrito disminuciones en el número de receptores AMPA en la corteza frontal y parietal del ratón (Magnusson y Cotman, 1993b), pero no en la corteza cerebral de la rata (Tamaru *et al.*, 1991; Cimino *et al.*, 1993). Por otra parte, en el hipocampo se han descrito disminuciones del número de receptores AMPA durante el envejecimiento en algunas áreas, pero no en todo el hipocampo (Cimino *et al.* 1993; Magnusson y Cotman, 1993b).

De modo similar a lo que ocurre con el receptor NMDA, la disminución del número de receptores AMPA en ciertas áreas del hipocampo (p. ej. en el área CA1, ver Magnusson y Cotman, 1993b) durante el envejecimiento es coherente con la disminución de la respuesta a la estimulación de estos receptores descrita por otros autores (Barnes *et al.*, 1992).

En relación con el receptor KA, en nuestro conocimiento sólo existe un trabajo que lo estudie en relación con el envejecimiento, señalando que no varía con la edad en corteza e hipocampo (Tamaru *et al.*, 1991).

No existen trabajos publicados que estudien otros receptores glutamatérgicos durante el envejecimiento. Por otra parte, algunos trabajos han descrito que la respuesta neuronal tras la aplicación exógena de GLU no cambia durante el envejecimiento (Lippa *et al.*, 1981; Rao *et al.*, 1993).

2.2.2.5. Acerca del efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica

La mayoría de los estudios muestran que las terminaciones nerviosas glutamatérgicas mantienen, durante el envejecimiento, su capacidad de liberar GLU tanto en condiciones basales como tras estimulaciones exógenas. Esta afirmación se apoya en estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando ratones y ratas como animales de experimentación y analizando varias estructuras cerebrales que incluyen corteza cerebral, hipocampo y estriado. Sin embargo, el análisis del componente postsináptico de la neurotransmisión glutamatérgica durante el envejecimiento demuestra que existe una disminución del número de receptores NMDA en la mayoría de las estructuras cerebrales estudiadas y del número de receptores AMPA en algunas áreas del hipocampo. Esta disminución del número de receptores es coherente con el descenso de la respuesta postsináptica tras la estimulación selectiva de los mismos en estas estructuras durante el envejecimiento.

Por otra parte, se ha descrito un aumento, durante el envejecimiento, de la afinidad de los receptores NMDA por el GLU, lo cual añade un grado más de confusión a la cuestión, ya que este aumento de afinidad podría

compensar la disminución del número de receptores glutamatérgicos. Es más, esta última posibilidad coincide con los resultados de algunos trabajos que han mostrado que no existen cambios de la respuesta a la aplicación exógena de GLU durante el envejecimiento.

Por tanto, los datos aquí revisados (y resumidos a continuación) acerca del efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatergica son, aún, insuficientes y controvertidos, por lo que no se puede aclarar si existe un déficit real de este sistema neurotransmisor en el animal viejo.

Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica en la corteza cerebral y el estriado de la rata

- Disminución de la concentración de GLU en algunas áreas de la corteza (?)
 - Conservación de la capacidad de liberar GLU en condiciones basales
 - Conservación de la capacidad de liberar GLU tras estimulación con K^+ (?)
 - Disminución del número de receptores NMDA
 - Aumento de la afinidad del receptor NMDA por el GLU
 - Disminución de la respuesta postsináptica a la estimulación del receptor NMDA
 - Disminución del número de receptores AMPA (?)
-

2.3. GABA

2.3.1. Neurotransmisión gabérgica

El aminoácido neutro ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (Mugnaini y Oertel, 1985). Su presencia en el tejido cerebral se descubrió en 1950, demostrándose su función neurotransmisora a finales de los años 60 (Krnjévić y Schwartz, 1966).

2.3.1.1. Metabolismo del GABA

En el cerebro adulto de los mamíferos, el GABA se sintetiza principalmente a partir de GLU en un solo paso enzimático catalizado por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). Esta enzima requiere la presencia de piridoxal fosfato como cofactor. Existen otras vías de síntesis de GABA en el cerebro (p. ej. a partir de putrescina) aunque se consideran de menor importancia (Martin y Rimvall, 1993).

La GAD es una enzima citoplasmática que se encuentra localizada sólo en las neuronas gabérgicas, por lo que se utiliza como marcador específico de estas neuronas (McGeer y McGeer, 1989). La reacción catalizada por la GAD es esencialmente irreversible, por lo que requiere de una estrecha regulación (Martin y Rimvall, 1993). Así, al menos un 50% de GAD está presente en el cerebro como apoenzima, constituyendo una reserva de GAD inactivo (Martin y Rimvall, 1993). Además, la GAD es inhibida por su producto (Porter y Martin, 1984), por Zn^{2+} y por α -cetogluturato (Wu, 1976).

La degradación del GABA se realiza a través de una reacción de transaminación catalizada por la GABA transaminasa (GABA-T). En esta reacción se produce la transaminación del GABA con el α -cetogluturato para originar semialdehído succínico y GLU. El semialdehído succínico es oxidado por la semialdehído succínico deshidrogenasa a ácido succínico, el cual entra en el ciclo de Krebs. Por su parte el GLU puede ser utilizado para la síntesis de GABA (McGeer y McGeer, 1989).

La GABA-T es una enzima mitocondrial que requiere piridoxal fosfato como cofactor. La disponibilidad de α -cetogluturato, metabolito intermedio del ciclo de Krebs, es un factor regulador importante de la actividad de la GABA-T (McGeer y McGeer, 1989).

Introducción

La ruta metabólica descrita (cortocircuito GABA) constituye un pequeño anexo al ciclo de Krebs en el cerebro, que ofrece una vía alternativa entre el α -cetoglutarato y el ácido succínico, cuya función principal es la biosíntesis de GABA en las terminaciones nerviosas (Martin y Rimvall, 1993). El cortocircuito GABA puede ser también completado en las células gliales ya que poseen todas las enzimas necesarias para la degradación del GABA captado desde el espacio sináptico (GABA-T y semialdehído succínico deshidrogenasa). El GLU formado en los astrocitos a través de la GABA-T, que no puede ser convertido en GABA debido a la falta de GAD, es transformado por la glutamina sintetasa en glutamina, la cual pasa a las terminaciones nerviosas. En éstas, la enzima glutaminasa convierte la glutamina en GLU manteniendo así el suministro de precursor de GABA (McGeer y McGeer, 1989).

2.3.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación del GABA

El GABA se almacena en vesículas sinápticas gracias a la acción de un sistema de transporte vesicular de baja afinidad, independiente de Na^+ y acoplado a un gradiente electroquímico de H^+ generado por una ATPasa dependiente de Mg^{2+} (Fykse y Fomnum, 1988).

Estudios *in vitro* han mostrado la liberación de GABA de forma dependiente de Ca^{2+} desde terminaciones nerviosas en respuesta a estímulos químicos despolarizantes o a la activación de una vía nerviosa (Nicholls, 1989). Esta liberación dependiente de Ca^{2+} se produce principalmente por exocitosis (Nicholls, 1989).

La inactivación del GABA liberado desde la terminación nerviosa se lleva a cabo a través de sistemas de transporte de alta afinidad localizados en la membrana presináptica y en

los elementos gliales circundantes. Hasta la fecha se han clonado 4 transportadores de GABA con diferentes afinidades para el GABA y diferentes farmacología y localización (ver Attwell y Mobbs, 1994). La estequiometría de este transporte parece ser el cotransporte de 1 GABA, 1 Cl^- y 2 Na^+ (Attwell y Mobbs, 1994).

Debido al carácter electrogénico del transporte de GABA así como a su dependencia del gradiente de Na^+ , la despolarización del terminal nervioso favorece la salida de GABA de forma independiente de Ca^{2+} . La existencia de esta liberación independiente de Ca^{2+} a través del transportador, que parece contribuir a la liberación de GABA inducida por despolarización, ha sido demostrada *in vitro* (Bernath y Zigmond, 1988; Meyer, 1991; Levi y Raiteri, 1993) e *in vivo* en las células horizontales de la retina (Schwartz, 1987).

2.3.1.3. Receptores gabérgicos

Se han descrito dos tipos diferentes de receptores para el GABA, caracterizados inicialmente por su diferente sensibilidad a agonistas y antagonistas: el receptor GABA-A, sensible al agonista muscimol y al antagonista bicuculina, pero insensible al agonista baclofén; y el receptor GABA-B, insensible a la bicuculina y sensible al baclofén. Diversos estudios farmacológicos y moleculares sugieren la existencia de una gran variedad de subtipos de receptores, tanto para el receptor GABA-A como para el GABA-B (Bormann, 1988; Burt y Kamatchi, 1991; Bonanno y Raiteri, 1993; MacDonald y Olsen, 1994; Sieghart, 1995).

El receptor GABA-A es un canal iónico con permeabilidad selectiva para el Cl^- . Contiene sitios de unión específicos para GABA, picrotoxina, barbitúricos, benzodiazepinas y anestésicos esteroideos. El sitio de

unión para el GABA regula la apertura del canal, requiriéndose al menos 2 moléculas de GABA para la activación del receptor (Sieghart, 1992, 1995; MacDonald y Olsen, 1994).

El receptor GABA-A se localiza principalmente a nivel postsináptico y es el responsable de la clásica acción inhibitoria postsináptica del GABA. La activación del receptor GABA-A produce la apertura breve del canal de Cl⁻, que hiperpolariza la membrana postsináptica (McGeer y McGeer, 1989). Las corrientes de Cl⁻ a través del receptor GABA-A pueden verse reducidas por la acción de picrotoxina y bicuculina (agentes convulsivos) y aumentadas por la acción de benzodiazepinas, barbitúricos y anestésicos esteroideos (agentes depresores del Sistema Nervioso Central) (MacDonald y Olsen, 1994).

Los receptores GABA-B se descubrieron al observar la presencia de receptores para GABA en terminaciones nerviosas periféricas insensibles a bicuculina y sensibles a baclofén (Bowery *et al.*, 1980). El receptor GABA-B está acoplado a la adenilato ciclasa a través de proteínas G y modula canales de Ca²⁺ en terminaciones nerviosas periféricas y de K⁺ en sinapsis centrales (Bowery, 1993; MacDonald y Olsen, 1994).

Los receptores GABA-B se localizan tanto pre como postsinápticamente, predominando en un lugar o en otro según la región cerebral (Bowery, 1993). Los receptores GABA-B presinápticos inhiben la liberación de neurotransmisores tales como GLU, noradrenalina, DA, serotonina y varios péptidos (substancia P, colecistoquinina, somatostatina). También actúan como autorreceptores, modulando la liberación de GABA. La activación de los receptores postsinápticos GABA-B producen potenciales postsinápticos inhibitorios (Bowery, 1993; Bittiger *et al.*, 1993).

2.3.1.4. Vías gabérgicas

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio distribuido más ampliamente en el Sistema Nervioso Central. Mientras que las neuronas monoaminérgicas y colinérgicas constituyen poblaciones relativamente pequeñas y localizadas, las neuronas gabérgicas se distribuyen de forma ubicua (Mugnaini y Oertel, 1985; McGeer y McGeer, 1989). Existen, además, regiones cerebrales en las que la gran mayoría de las neuronas presentes son gabérgicas (p.ej. estriado, núcleo pálido, sustancia negra *pars reticulata*, varios núcleos de la amígdala y el núcleo interpeduncular) (Mugnaini y Oertel, 1985).

Las neuronas gabérgicas pueden ser tanto interneuronas, integradas dentro de circuitos locales inhibitorios, como neuronas de proyección (Fagg y Foster, 1983; McGeer y McGeer, 1989).

El GABA está localizado sobre todo en interneuronas en la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el hipotálamo y la retina. También existen interneuronas gabérgicas en el estriado, el tálamo, los colículos superior e inferior, el cerebelo y la médula espinal (Fagg y Foster, 1983; Mugnaini y Oertel, 1985).

Las vías de proyección gabérgicas mejor conocidas son las proyecciones de las células cerebelosas de Purkinje y de las neuronas estriatonigrales. En los últimos años se han descrito neuronas de proyección gabérgicas, incluso en áreas donde había sido postulada su total ausencia, por ejemplo, en la corteza y el hipocampo.

Los ganglios basales son la región cerebral que presenta mayor abundancia de proyecciones gabérgicas, formando circuitos complejos donde los procesos de inhibición y

Introducción

desinhibición juegan un papel fundamental (Fagg y Foster, 1983; Mugnaini y Oertel, 1985; McGeer y McGeer, 1989). Se han descrito vías

de proyección gabérgica desde el estriado a la sustancia negra y al núcleo pálido y desde éste a núcleos talámicos.

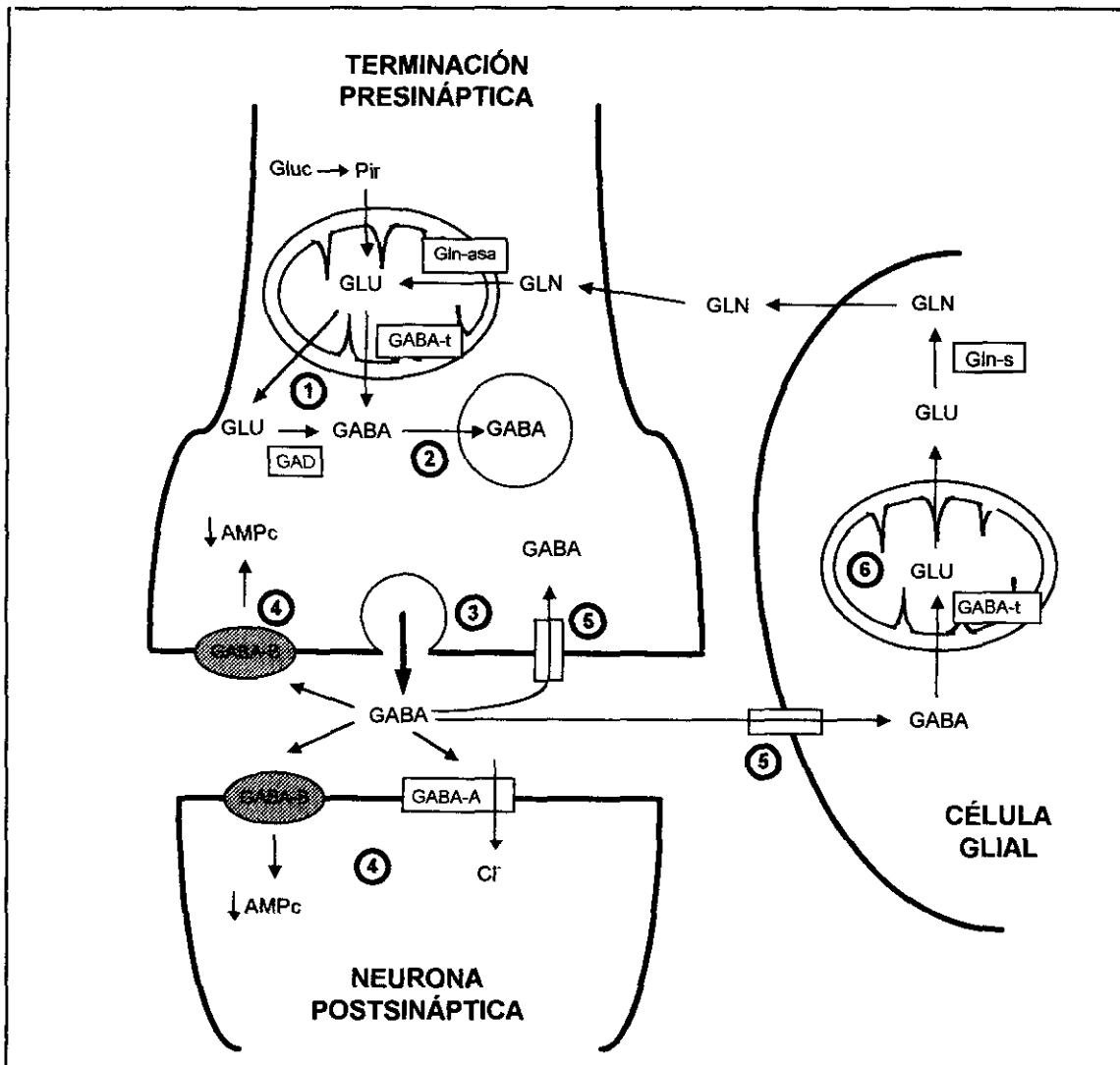


Fig. 3. Esquema de los procesos relacionados con la transmisión gabérgica. ① Síntesis de GABA a partir de glutamina (GLU) tanto en la mitocondria, por acción de la GABA transferasa (GABA-t), como en el citoplasma, por acción de la glutámico deshidrogenasa (GAD). El GLU utilizado procede de la síntesis a partir de glutamina por acción de la glutaminasa (Gln-asa) o de la síntesis a partir de glucosa (Gluc) (Pir: piruvato). ② Almacenamiento de GABA en vesículas presinápticas. ③ Liberación de GABA por exocitosis. ④ La unión del GABA a los receptores GABA-A produce la entrada de Cl⁻ en la neurona postsináptica. La activación de los receptores GABA-B pre- y post-sinápticos disminuye, en general, la producción de AMPc. ⑤ La inactivación del GABA se produce por recaptación a través de transportadores situados en las terminaciones presinápticas y en las células gliales. ⑥ El GABA recaptado por las células gliales es transformado en GLU por acción de la GABA-t y, después, en GLN a través de la acción de la glutamina sintetasa (Gln-s). La GLN glial es liberada al espacio extracelular y captada por las terminaciones presinápticas y utilizada para sintetizar GLU y GABA.

Introducción

2.3.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión gabérgica

Los estudios acerca del efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión gabérgica son escasos y sus resultados son poco consistentes.

2.3.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de GABA en muestras de tejido cerebral

La concentración de GABA en muestras de tejido cerebral es un indicador válido de la cantidad de GABA de que disponen las terminaciones gabérgicas, puesto que el GABA, a diferencia del GLU, no interviene en el metabolismo celular. Sin embargo, existen pocos estudios que hayan analizado la concentración de GABA en muestras de tejido cerebral a lo largo del envejecimiento. Sus resultados, además, son contradictorios. Por ejemplo en la corteza prefrontal dorsal se ha descrito un aumento de la concentración de GABA con la edad (Fornieles *et al.*, 1986), aunque Donzanti y Ung (1990) no han reproducido este hallazgo. En el estriado, Strolin Benedetti *et al.* (1990) y Donzanti y Ung (1990) han descrito un aumento de GABA con la edad; sin embargo, Banay-Schwartz *et al.* (1989) describen una disminución de la concentración de GABA. En la sustancia negra Strolin Benedetti *et al.* (1990) describen un aumento de la concentración de GABA mientras Banay-Schwartz *et al.* (1989) no detectan cambios.

Tanto por la escasez de estudios como por la disparidad de sus resultados (que se pueden

deber, en parte, a las diferentes técnicas utilizadas), no podemos extraer conclusiones claras sobre el efecto que pueda tener el envejecimiento en la concentración tisular de GABA.

Por otra parte, la actividad de la enzima de síntesis del GABA, la GAD, no parece modificarse con la edad en el estriado de la rata (Lai *et al.*, 1981; Strong *et al.*, 1982), aunque se han descrito disminuciones de la actividad de la GAD en el colículo inferior y en el núcleo del lemnisco lateral (Gutierrez *et al.*, 1994; Raza *et al.*, 1994).

2.3.2.2. Efectos del envejecimiento sobre los receptores gabérgicos

De forma similar a lo que ocurre con los estudios sobre la concentración tisular de GABA, los estudios sobre el efecto que el envejecimiento tiene en los receptores de GABA son muy escasos. En corteza cerebral parece que el número de receptores de GABA-A no varía con la edad (Wenk *et al.*, 1991; Gutierrez *et al.*, 1994), aunque se han descrito modificaciones en sus propiedades (Samochocki y Strosznajder, 1994). En relación con el receptor GABA-B no se han descrito variaciones de su número en el cerebro de la rata durante el envejecimiento (Turgeon y Albin, 1994).

En un trabajo reciente, Abdulla *et al.* (1995) han descrito un aumento de la sensibilidad de las neuronas de la corteza frontal a la aplicación de bicuculina que indica la existencia de un tono gabérgico aumentado en esta región cortical en las ratas viejas.

3. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES

Desde hace algunos años se ha venido estudiando con intensidad un aspecto nuevo de la neurotransmisión: el modo en que un neurotransmisor puede modular la neurotransmisión mediada por otros y verse, a su vez, modulado por ellos. A este hecho se le ha llamado «*interacción de neurotransmisores*».

Durante los últimos años, varios grupos de investigación se han dedicado a estudiar este fenómeno. Concretamente, la mayoría de los estudios se ha centrado en el estriado, una estructura que, por el conocimiento que tenemos de las vías neurales en las que participa y los neurotransmisores implicados en ellas, sirve de modelo ideal para estudiar la interacción de neurotransmisores (ver p. ej. las revisiones de Carlsson y Carlsson, 1990; Lannes y Micheletti, 1994; Mora y Porras, 1994; Di Chiara y Morelli, 1994; Kötter, 1994). Más recientemente, la corteza prefrontal ha sido, también, objeto de este tipo de estudios (ver Sanz, 1995).

3.1. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN EL ESTRIADO

3.1.1. Conexiones neurales y neurotransmisores del estriado

El estriado, como ya se ha señalado, ha sido el modelo utilizado de forma preferente para estudiar la interacción de neurotransmisores. Esta preferencia se debe, en buena parte, al conocimiento que se posee actualmente de las vías neurales en las que participa el estriado y de los neurotransmisores que están implicados en estas vías (ver p. ej. las revisiones de Smith y Bolam, 1990 y de Parent y Hazrati, 1995).

En la rata, la mayoría de las neuronas del estriado son de tamaño medio y sus dendritas están recubiertas de abundantes espinas dendríticas. Los axones de estas neuronas forman las eferencias del estriado hacia sustancia negra (*pars compacta*), núcleo pálido (núcleo pálido externo en primates) y núcleo entopeduncular (núcleo pálido interno en los primates). Estos axones poseen, además, ramas

Introducción

colaterales cuyas terminaciones están situadas dentro del propio estriado. Estas neuronas contienen GABA como neurotransmisor.

Entre estas neuronas gabérgicas se pueden diferenciar dos subpoblaciones en función de la coexistencia en ellas de diferentes péptidos y del área cerebral de destino de sus axones. Así, las neuronas gabérgicas cuyos axones terminan en el núcleo entopeduncular contienen también dinorfina y sustancia P; las neuronas gabérgicas cuyos axones terminan en el núcleo pálido contienen también encefalinas; y las neuronas gabérgicas cuyos axones terminan en la sustancia negra contienen encefalinas, sustancia P y/o dinorfinas (Parent y Hazrati, 1995).

Aparte de las neuronas espinosas de tamaño medio, el estriado contiene una pequeña proporción de neuronas de gran tamaño cuyas dendritas no están recubiertas de espinas y cuyos axones terminan dentro del estriado. Estas neuronas contienen acetilcolina como neurotransmisor (ver Smith y Bolam, 1990). También existe una pequeña proporción de interneuronas de tamaño medio y sin espinas: algunas de ellas contienen GABA y parvalbúmina; otras contienen somatostatina, neuropéptido Y y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-diaforasa, la enzima de síntesis del óxido nítrico (ver Parent y Hazrati, 1995).

Las neuronas del estriado están conectadas entre sí. Las terminaciones nerviosas acetilcolinérgicas de las grandes neuronas sin espinas forman sinapsis en la porción proximal de las dendritas de las neuronas espinosas. Por otra parte, las terminaciones nerviosas gabérgicas de las ramas colaterales de los axones de neuronas espinosas del propio estriado forman sinapsis con las grandes neuronas acetilcolinérgicas y con otras neuronas espinosas del estriado (ver Smith y Bolam, 1990 y Parent y Hazrati, 1995).

Las aferencias que llegan al estriado proceden, fundamentalmente, de la corteza cerebral y del mesencéfalo. También existen aferencias procedentes del tálamo.

Las terminaciones nerviosas procedentes de la corteza cerebral contienen GLU como neurotransmisor y forman sinapsis axodendríticas con la porción distal de las dendritas de las neuronas espinosas (Smith y Bolam, 1990; Parent y Hazrati, 1995) y, en pequeña proporción, sobre las neuronas acetilcolinérgicas y sobre las neuronas con neuropéptido Y (Vuillet *et al.*, 1989; Dimova *et al.*, 1993). También existen terminaciones nerviosas glutamatérgicas procedentes de núcleos talámicos (principalmente del núcleo parafascicular) que forman sinapsis con las grandes neuronas acetilcolinérgicas del estriado (Lapper y Bolam, 1992).

Las terminaciones nerviosas procedentes de áreas mesencefálicas (fundamentalmente de sustancia negra, *pars compacta*) contienen DA como neurotransmisor y forman sinapsis axodendríticas con la porción distal del árbol dendrítico de las neuronas espinosas del estriado. También existen terminaciones nerviosas dopaminérgicas procedentes del mesencéfalo que forman sinapsis con el cuerpo celular y la porción proximal de las dendritas de las grandes neuronas del estriado (ver Dimova *et al.*, 1993).

Se han descrito también terminaciones gabérgicas que llegan al estriado procedentes del núcleo pálido y de la sustancia negra, *pars reticulata*, aunque estas proyecciones se consideran escasas (ver Kita, 1993).

En resumen, las neuronas del estriado (neuronas espinosas de tamaño medio gabérgicas; neuronas de tamaño medio sin espinas con neuropéptido Y y neuronas grandes acetilcolinérgicas) reciben aferencias

glutamatérgicas procedentes de la corteza y aferencias dopaminérgicas procedentes del mesencéfalo. Estas aferencias convergen fundamentalmente en las neuronas gabérgicas. Se discute si las aferencias talámicas convergen o no en las mismas neuronas que las aferencias corticales (ver Parent y Hazrati, 1995).

Tanto las neuronas gabérgicas como las acetilcolinérgicas presentan receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos en sus membranas.

Los receptores dopaminérgicos D1 (D1A) se localizan fundamentalmente en las neuronas gabérgicas que contienen también sustancia P y que proyectan a sustancia negra y a núcleo entopeduncular. Los receptores dopaminérgicos D2 (D2A) se localizan fundamentalmente en las neuronas gabérgicas que contienen también encefalinas y que proyectan a núcleo pálido, en las neuronas acetilcolinérgicas y en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Yung *et al.*, 1995).

Esta visión de los receptores dopaminérgicos claramente disgregados en poblaciones neuronales bien determinadas ha sido criticada recientemente por Surmeier *et al.* (1992) quienes afirman que la mayoría de las neuronas de estriado expresan ambos tipos de receptores dopaminérgicos. De hecho, Le Moine *et al.*, (1990, 1991) han descrito que algunas de las grandes neuronas acetilcolinérgicas del estriado expresan no sólo receptores D2, sino también receptores D1.

También se ha descrito la presencia de receptores D2 en terminaciones nerviosas dopaminérgicas (autorreceptores) y en terminaciones nerviosas no dopaminérgicas que, probablemente (aunque no se ha confirmado), proceden de la corteza y son, por tanto, glutamatérgicas (Yung *et al.*, 1995). Este último hecho es controvertido. La posible

existencia de receptores dopaminérgicos en las terminaciones nerviosas del estriado que proceden de la corteza ha sido defendida por algunos autores (ver p. ej. Kornhuber y Kornhuber, 1986; Maura *et al.*, 1988) a pesar de que se había descrito que las conexiones sinápticas axo-axónicas eran muy raras, si no inexistentes, en el estriado (ver Kornhuber y Kornhuber, 1983 y la revisión de Parent y Hazrati, 1995). Además, otros autores no han logrado demostrar la existencia de receptores de DA en estas terminaciones (ver p. ej. Trugman *et al.*, 1986; Joyce y Marshall, 1987). La descripción reciente de la presencia de receptores para DA fuera de estructuras sinápticas (Yung *et al.*, 1995) podría explicar la existencia de receptores dopaminérgicos en terminaciones glutamatérgicas del estriado a pesar de la ausencia de sinapsis axo-axónicas. Además, basándose en este tipo de descripciones, se ha sugerido la existencia de un tipo de transmisión nerviosa diferente del conocido clásicamente (confinado a la conexión sináptica) del que se ha venido hablando en los últimos años con el término de «transmisión volumétrica» (para una revisión extensa del concepto de transmisión volumétrica ver Fuxe y Agnati, 1991).

En relación con los receptores de GLU en el estriado, se ha descrito la presencia fundamentalmente de receptores NMDA y AMPA situados, probablemente, en las neuronas gabérgicas y acetilcolinérgicas. Se discute sobre la existencia o no de receptores de GLU en las terminaciones dopaminérgicas del estriado procedentes del mesencéfalo. Aunque la ausencia de conexiones axo-axónicas en esta estructura sugerirían que no existen receptores glutamatérgicos en terminaciones dopaminérgicas, no se puede excluir esta posibilidad (ver más arriba).

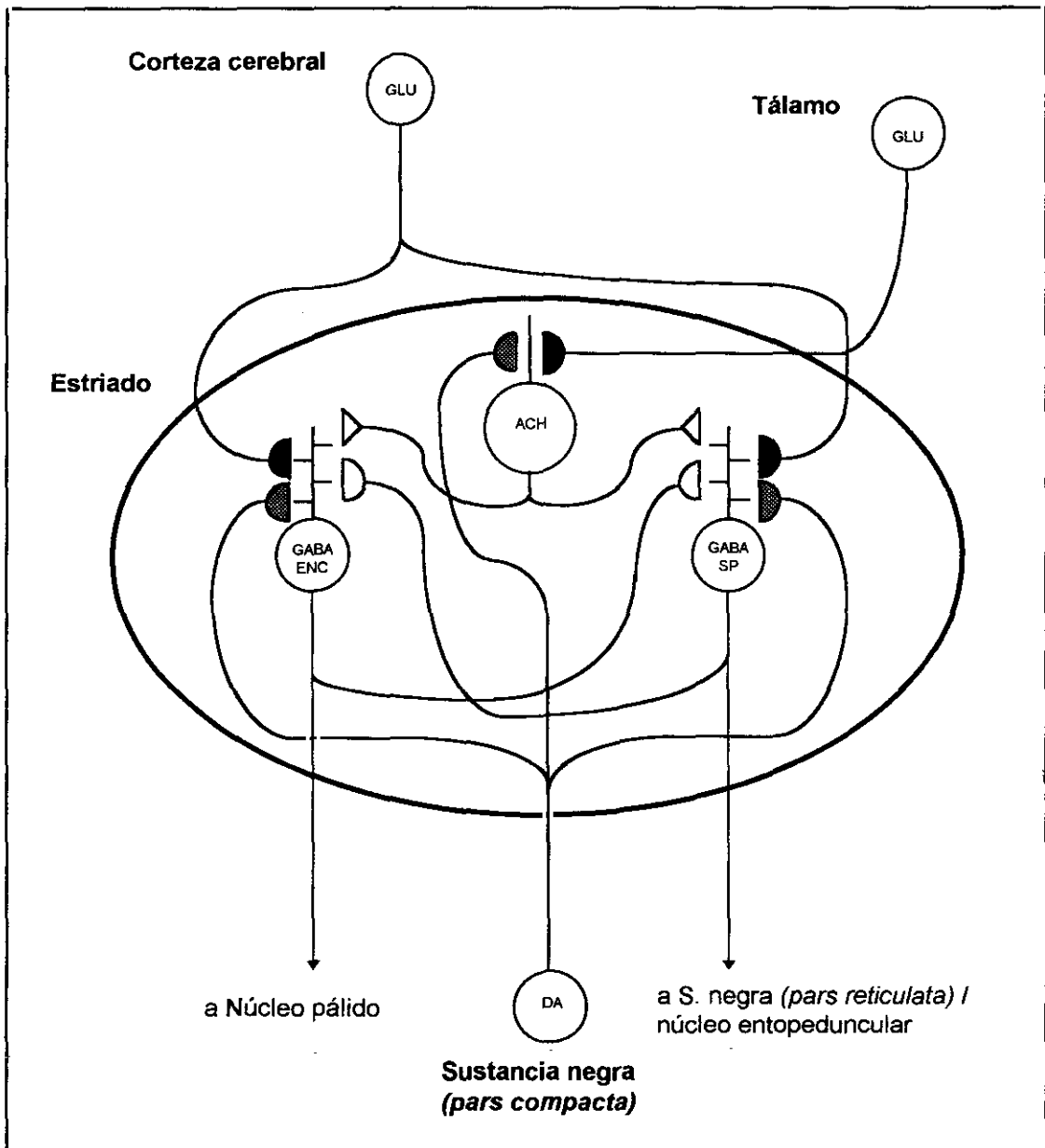


Fig. 4. Esquema de las conexiones neurales y los neurotransmisores del estriado de la rata. No se representan las neuronas de tamaño mediano sin espinas. Se han diferenciado las neuronas espinosas de mediano tamaño según el destino de sus axones y los péptidos que contienen (ENC: encefalinas; SP: sustancia P). Los semicírculos negros representan las terminaciones glutamatérgicas (GLU); los semicírculos grises representan las terminaciones dopaminérgicas (DA); los semicírculos blancos representan las terminaciones gabérgicas (GABA); los triángulos representan las terminaciones acetilcolinérgicas (ACH). Basado en Smith y Bolam, 1990 y Parent y Hazrati, 1995.

3.1.2. Interacción de neurotransmisores en el estriado de la rata

En los últimos años se han publicado un gran número de trabajos que estudian el efecto de agonistas y antagonistas de diferentes neurotransmisores sobre las concentraciones de otros neurotransmisores en el estriado de animales de experimentación.

Centrándonos fundamentalmente en los estudios realizados con técnicas *in vivo* (*push-pull* y microdiálisis), se han descrito diferentes cambios en las concentraciones extracelulares de varios neurotransmisores como respuesta a la aplicación, local o sistémica, de múltiples agonistas y antagonistas de receptores de DA, GLU, GABA y acetilcolina (para varias revisiones se pueden consultar p. ej. Keefe *et al.*, 1993b; Lannes y Micheletti, 1994; Di Chiara *et al.*, 1994). De hecho, la aplicación de las técnicas de perfusión *in vivo* ha contribuido en gran medida a la extensión de los estudios sobre interacción de neurotransmisores. Ante la amplitud del número de trabajos publicados sobre este asunto en los últimos quince años, aquí se describen los estudios más relevantes para la discusión de nuestros resultados, sin hacer una enumeración exhaustiva de referencias bibliográficas que apoyan un mismo hecho.

3.1.2.1. Efecto de agonistas y antagonistas glutamatérgicos

La aplicación de agonistas glutamatérgicos (tanto el propio GLU como NMDA, AMPA y KA) en el estriado produce liberación de DA (ver p. ej. Carter *et al.*, 1988; Barbeito *et al.*, 1990; Imperato *et al.*, 1990; Leviel *et al.*, 1990; Moghaddam y Gruen, 1991; Keefe *et al.*, 1992, 1993a; Martínez-Fong *et al.*, 1992; Morari *et al.*, 1994), GABA (Morari *et al.*, 1993, 1994; Young y Bardford, 1993) y acetilcolina (Damsma *et al.*, 1991).

El hecho de que el GLU produzca una liberación de GABA y de acetilcolina en el estriado es coherente con la presencia de receptores de GLU en neuronas gabérgicas y acetilcolinérgicas en esta estructura cerebral y con la actividad excitadora de estos receptores.

Más difícil de explicar, sin embargo, es la liberación de DA inducida por GLU en el estriado, dada la ausencia de conexiones axo-axónicas en el estriado entre las terminaciones glutamatérgicas y las dopaminérgicas. Para explicar esta contradicción entre los resultados de los estudios neuroquímicos y de los estudios histológicos se ha sugerido la existencia de receptores de GLU en las terminaciones nerviosas dopaminérgicas fuera de estructuras sinápticas (neurotransmisión volumétrica) (ver p. ej. Lannes y Micheletti, 1994). Por otra parte, también se ha sugerido que la DA liberada por el GLU proceda de la que está presente en el citoplasma más que de la DA almacenada en vesículas a través de un efecto del GLU sobre el transportador de DA de las membranas neuronales (Lannes y Micheletti, 1994). Además, recientemente se ha sugerido que la activación de receptores de GLU podría producir su efecto sobre la DA a través de la liberación de óxido nítrico (Hanbauer *et al.*, 1994).

El efecto de la aplicación de agonistas del GLU sobre la liberación de DA parece ser diferente dependiendo de la concentración de agonista utilizado. Así, Chéramy *et al.* (1986) han descrito que concentraciones de GLU por debajo de 0.1 mM estimulan la liberación de DA, mientras por encima de 10 mM podrían inhibirla. Leviel *et al.* (1990) han interpretado estos resultados sugiriendo que el GLU tendría un efecto excitador directo a través de receptores no NMDA e inhibitorio a través de receptores NMDA que activarían interneuronas inhibitorias.

Introducción

3.1.2.2. Efecto de agonistas y antagonistas dopaminérgicos

La aplicación de agonistas dopaminérgicos estimula la liberación de acetilcolina a través de receptores D1 (Consolo *et al.*, 1987; Bertorelli y Consolo, 1990; Consolo *et al.*, 1992; Stoof *et al.*, 1992; Zocchi y Pert, 1993; ver la revisión de Di Chiara *et al.*, 1994), pero la disminuye a través de receptores D2 (Stoof *et al.*, 1982; Bertorelli y Consolo, 1990; DeBoer *et al.*, 1992).

Los agonistas dopaminérgicos inespecíficos también inducen la liberación de GLU (Godukhin *et al.*, 1984; Expósito *et al.*, 1994) y de GABA (Girault *et al.*, 1986b), mientras que los antagonistas dopaminérgicos no tienen ningún efecto sobre GLU y GABA (Daly y Moghaddam, 1993; Morari *et al.*, 1994).

La liberación de acetilcolina y GABA inducida por DA es coherente con la presencia de receptores de DA en las neuronas acetilcolinérgicas y gabérgicas y con la actividad excitadora de aquéllos. Se ha sugerido que el efecto inhibitorio de los agonistas D2 sobre la liberación de acetilcolina se deba a que son autorreceptores y disminuyen, por tanto, la liberación de DA (Damsma *et al.*, 1991).

En relación con el efecto que la DA pueda tener sobre la liberación de GLU en el estriado, se han sugerido varias posibilidades, incluyendo la existencia de un mecanismo volumétrico de transmisión a nivel local y la participación de circuitos neurales largos (ver la Discusión de esta Tesis Doctoral).

Por otra parte, agonistas selectivos de los receptores D1 o D2 no afectan a la liberación basal de GLU y GABA (Yamamoto y Davy, 1992), indicando que el efecto de los agonistas no específicos puede deberse a un balance entre los efectos excitadores de los receptores D1 y los efectos inhibitorios de los receptores D2 (ver la Discusión de esta Tesis Doctoral).

Por otra parte, el efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores de DA sobre estos neurotransmisores en el estriado es diferente según se estudien en condiciones basales (lo revisado hasta ahora) o en condiciones de estimulación de la liberación (p. ej. con altas concentraciones de K^+). Así, se ha descrito que los agonistas selectivos D2 (pero no los D1) bloquean la liberación de GLU estimulada por K^+ (Yamamoto y Davy, 1992), mientras que ninguno de ellos tiene efecto sobre la liberación estimulada de GABA. Sin embargo, un agonista inespecífico de la DA sí inhibe la liberación de GABA inducida por K^+ (Tossmann y Ungerstedt, 1986).

Estos resultados sugieren que la DA puede modular la liberación fásica (estimulada) más que la liberación tónica (basal) de GLU y GABA (ver Lannes y Micheletti, 1994).

3.1.2.3. Efecto de agonistas y antagonistas gabérgicos

Los agonistas de los receptores GABA-A producen en el estriado una disminución de la liberación de acetilcolina (DeBoer y Westerink, 1994), mientras que los antagonistas de los receptores GABA-A producen un aumento de la liberación de acetilcolina (DeBoer y Westerink, 1994) y de DA (Gruen *et al.*, 1992).

Los agonistas de los receptores GABA-B producen, en el estriado, una disminución de la liberación de acetilcolina (DeBoer y Westerink, 1994) sin afectar a la liberación de DA (Santiago *et al.*, 1993a), mientras que los antagonistas de los receptores GABA-B no producen ningún efecto sobre la liberación de acetilcolina en el estriado (DeBoer y Westerink, 1994).

En general, se ha sugerido que el GABA modula la liberación de GLU y DA en el estriado (Scheel-Krüger, 1986; Yoshida *et al.*, 1993).

El efecto de la estimulación de receptores de GABA sobre la acetilcolina es coherente con la presencia de aquéllos en las neuronas acetilcolinérgicas del estriado. El efecto modulador del GABA sobre la liberación de GLU y DA, sin embargo, sólo puede ser explicado por la existencia de receptores de GABA en terminaciones glutamatérgicas y dopaminérgicas (que no han sido descritos) o porque el efecto del GABA esté mediado por la activación de vías neurales largas que lleguen a corteza cerebral y a sustancia negra.

3.2. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN LA CORTEZA PREFRONTAL

3.2.1. Conexiones neurales y neurotransmisores de la corteza prefrontal

Las neuronas piramidales de corteza prefrontal de la rata así como una pequeña proporción de neuronas no piramidales, contienen GLU (Ottersen y Storm-Mathissen, 1984). Los axones de las neuronas piramidales de la corteza constituyen las proyecciones de la corteza a estructuras subcorticales (ver la revisión de Cotman *et al.*, 1987). De estas proyecciones, la que llega a estriado ha sido ampliamente estudiada (ver p. ej. Fonnum *et al.*, 1981 y Girault *et al.*, 1986a). Las terminaciones de esta vía córtico-estriatal hacen sinapsis sobre las neuronas gabérgicas del estriado (Smith y Bolam, 1990).

El GABA se encuentra en la corteza prefrontal fundamentalmente en interneuronas (Esclapez *et al.*, 1987), aunque también existen terminaciones nerviosas que contienen GABA y que proceden del área ventrotegmental del mesencéfalo (Pirot *et al.*, 1992). Las terminaciones gabérgicas forman sinapsis en el soma neuronal y en la porción proximal del axón de las neuronas piramidales, las cuales presentan receptores GABA-A y GABA-B (Bowery *et al.*, 1987; Bonanno y Raiteri, 1993)

La DA se encuentra en la corteza prefrontal en terminaciones nerviosas procedentes del área ventrotegmental del mesencéfalo (Thierry *et al.*, 1973; Lindvall y Bjöklund 1974). Estas terminaciones dopaminérgicas hacen sinapsis en las dendritas de las neuronas piramidales corticales (Van Eden *et al.*, 1987; Séguéla *et al.*, 1988; Verney *et al.*, 1990). Se ha sugerido que las dendritas de las neuronas piramidales corticales presentan receptores D1 (Retaux *et al.*, 1991a) y que las terminaciones nerviosas de las ramas recurrentes de sus axones presentan receptores D2 (Retaux *et al.*, 1991b; Law-Tho *et al.*, 1994).

La corteza prefrontal de la rata posee también interneuronas acetilcolinérgicas así como terminaciones nerviosas acetilcolinérgicas procedentes de los núcleos basales de Meynert. Estas terminaciones forman sinapsis axo-dendríticas con las neuronas piramidales de la corteza (Houser *et al.*, 1983, 1985).

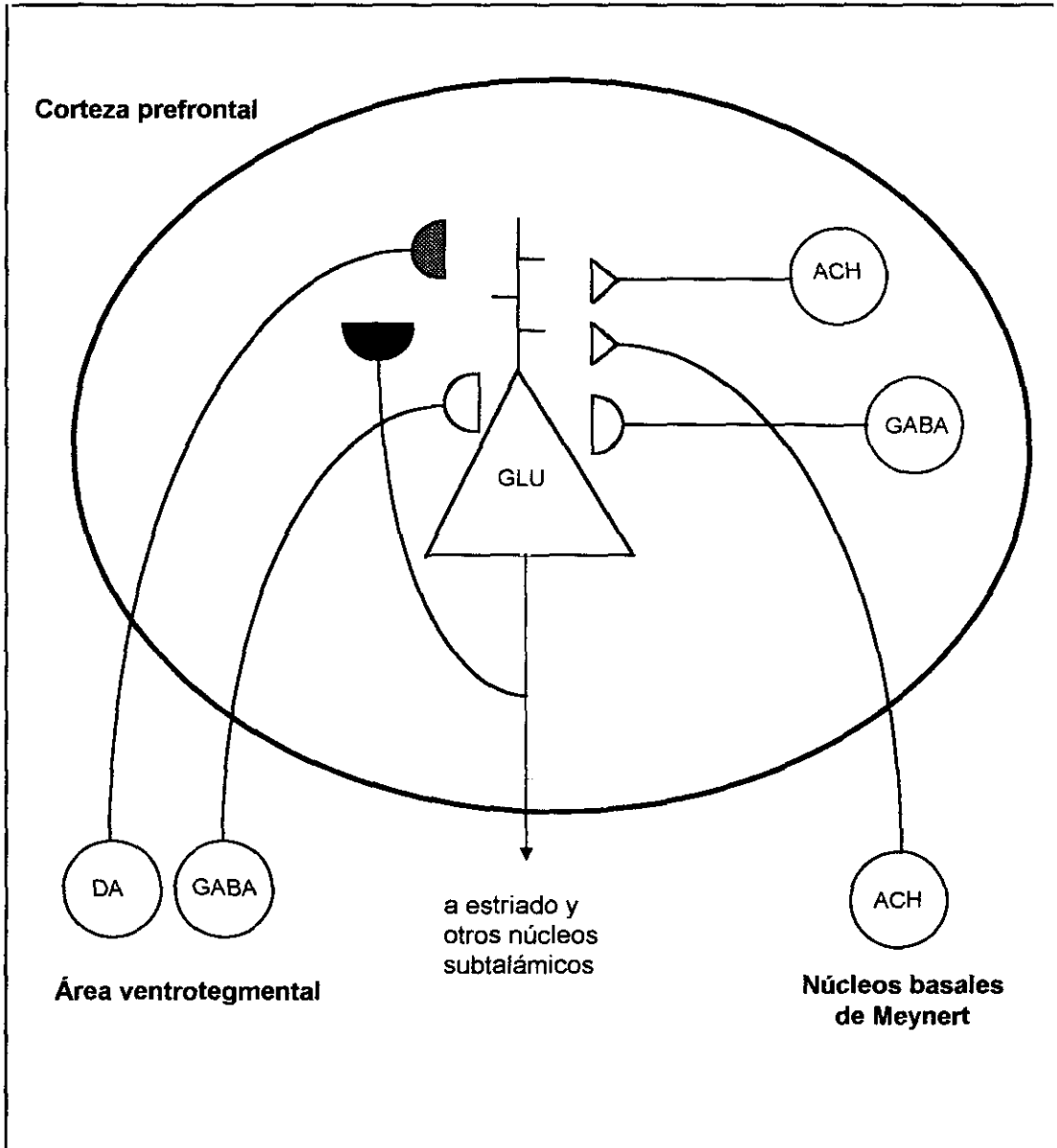


Fig. 5. Esquema de las conexiones neurales y los neurotransmisores de la corteza prefrontal de la rata. Los semicírculos negros representan las terminaciones glutamatergicas (GLU); los semicírculos grises representan las terminaciones dopaminérgicas (DA); los semicírculos blancos representan las terminaciones gabérgicas (GABA); los triángulos representan las terminaciones acetilcolinérgicas (ACH). Basado en Van Eden et al., 1987; Séguéla et al., 1988 y Verney et al., 1990.

3.2.2. Interacción de neurotransmisores en la corteza prefrontal de la rata

A pesar de que recientemente la corteza prefrontal está recibiendo mayor atención en relación con la interacción de neurotransmisores, las publicaciones sobre interacción de neurotransmisores en esta estructura cerebral son más escasas que las realizadas sobre estriado.

La estimulación de receptores glutamatergicos AMPA y KA producen liberación de DA en la corteza prefrontal (Jedema y Moghaddam, 1996). Sin embargo, la estimulación de receptores NMDA no produce liberación de DA, aunque sí de GABA (Jedema y Moghaddam, 1996). Se ha descrito que el efecto de la aplicación de NMDA es diferente según las dosis utilizadas. Así, 1 mM de NMDA induce liberación de DA en la corteza, pero 0.1 mM de NMDA inhibe la liberación de DA (Feenstra *et al.*, 1995). Por otra parte, el bloqueo de los receptores NMDA produce liberación de DA (Wedzony *et al.*, 1993; Nishijima *et al.*, 1994).

No está claro cómo la estimulación de receptores glutamatergicos AMPA y KA produce una liberación de DA en la corteza prefrontal, ya que no se ha descrito la presencia de estos receptores en terminaciones dopaminérgicas en esta estructura cerebral. Tampoco está clara la función del receptor NMDA como modulador de la neurotransmisión dopami-

nérgica en la corteza prefrontal, aunque los datos disponibles apuntan a que tendría una función inhibitoria de las terminaciones dopaminérgicas, probablemente a través de la estimulación de interneuronas gabérgicas.

En relación con el efecto de la aplicación de agonistas y antagonistas dopaminérgicos se ha descrito que el bloqueo de receptores de DA con haloperidol aumenta la liberación de DA sin modificar la de GLU (Bean y Roth, 1991; Daly y Moghaddam, 1993; Pehek y Yamamoto, 1994). Por otra parte, estudios *in vitro* han descrito que la estimulación de receptores de DA produce liberación de GABA (a través de receptores D2) (Retaux *et al.*, 1991a), pero también inhibición de la liberación de GABA inducida eléctricamente (Retaux *et al.*, 1991b).

La aplicación de agonistas de los receptores GABA-A no afecta a la liberación de DA, aunque su bloqueo produce un aumento de la liberación de DA (Santiago *et al.*, 1993b), indicando que el GABA inhibe de forma tónica la liberación de DA. Por otra parte, la estimulación de receptores GABA-B reduce la liberación *in vivo* de DA (Santiago *et al.*, 1993b) y la liberación *in vitro* de GLU (Pende *et al.*, 1993), mientras que su bloqueo aumenta la liberación de DA (Santiago *et al.*, 1993b), lo cual sugiere la existencia de receptores GABA-B a nivel de las terminaciones dopaminérgicas y glutamatergicas con función inhibitoria.

4. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL: PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

La modulación recíproca de la transmisión neural mediada por diferentes neurotransmisores es un campo relativamente nuevo de investigación en neurociencias (ver p. ej. las revisiones de Lannes y Micheletti, 1994; Mora y Porras, 1994; Di Chiara y Morelli, 1994). Aunque la forma en la que diferentes neurotransmisores se modulan recíprocamente en diferentes estructuras cerebrales todavía no se comprende bien, este concepto de interacción de neurotransmisores podría ayudarnos a entender mejor el funcionamiento del cerebro y sus alteraciones. Por ejemplo, la comprensión de que en el estriado existe un balance entre la neurotransmisión dopaminérgica y la neurotransmisión acetilcolinérgica ayudó a buscar nuevos tratamientos para la enfermedad de Parkinson. Recientemente, la revisión de esta interacción entre la DA y la acetilcolina a la vista de los resultados sobre interacción entre DA y GLU está abriendo una nueva vía en el tratamiento farmacológico de la

enfermedad de Parkinson (ver la revisión de Schmidt *et al.*, 1992). Una alteración en la interacción de neurotransmisores podría estar implicada también en la esquizofrenia (ver p. ej. Carlsson y Carlsson, 1990; Grace, 1991; Lannes y Micheletti, 1994).

A la vista de que el concepto de interacción de neurotransmisores puede explicar mejor las alteraciones que ocurren en algunas enfermedades psiquiátricas y neurológicas, es coherente pensar que también podría explicar los cambios que se producen durante el envejecimiento. Por ejemplo, las alteraciones motoras que se observan durante el envejecimiento, y que tradicionalmente se han considerado producidas por la alteración aislada de la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado, pueden entenderse mejor como la consecuencia de una alteración de la interacción de neurotransmisores en esta región cerebral.

Algunos autores han descrito ya ciertas alteraciones en la interacción de neurotransmisores durante el envejecimiento. Por ejemplo, Thompson *et al.*, (1984) y Joseph *et al.*, (1988) han descrito, con técnicas *in vitro*, la existencia de un deterioro en la interacción

Introducción

entre la DA y la acetilcolina en el estriado de la rata.

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar la interacción de neurotransmisores durante el proceso de envejecimiento. Con este fin se diseñaron, en primer lugar, experimentos para abordar el conocimiento de la interacción que existe entre la DA, el GLU y el GABA en el estriado y la corteza prefrontal de la rata adulta joven. A continuación se diseñaron experimentos con el fin de estudiar la interacción entre estos neurotransmisores a lo largo del proceso de envejecimiento de la rata.

La elección del estriado y de la corteza cerebral como estructuras objeto de estudio obedece a dos razones.

En primer lugar, ambas han sido objeto de investigación sobre interacción de neurotransmisores debido a los conocimientos que se tienen sobre los neurotransmisores que contienen y las vías neurales en las que están implicadas. Así, en el estriado, las neuronas gabérgicas reciben aferencias glutamatérgicas procedentes de la corteza y aferencias dopaminérgicas procedentes de la sustancia negra (Smith y Bolam, 1990; Parent y Hazrati, 1995). En la corteza prefrontal, las neuronas piramidales son glutamatérgicas y reciben aferencias dopaminérgicas procedentes del área ventrotectal del mesencéfalo y aferencias gabérgicas procedentes de interneuronas de la propia corteza (Van Eden *et al.*, 1987; Séguéla *et al.*, 1988; Verney *et al.*, 1990). En resumen, tanto en el estriado como en la corteza prefrontal existe una base anatómica y neuroquímica para la existencia de una interacción entre DA, GLU y GABA.

En segundo lugar, ambas estructuras están implicadas en las alteraciones de la conducta que pueden observarse en el proceso de envejecimiento: el estriado ha sido implicado en los trastornos de la coordinación de

movimientos que ocurren durante el envejecimiento, y la corteza prefrontal ha sido implicada en los trastornos cognitivos de los ancianos.

Con el fin de cumplir el objetivo de esta Tesis Doctoral, se realizaron los siguientes experimentos:

1. Estudio del efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina a las dosis de 5, 10 y 20 μM sobre las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN en el estriado de la rata adulta joven.
2. Estudio del efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina a las dosis de 10 y 20 μM sobre las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN en el estriado de la rata de edad media.
3. Estudio del efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina a las dosis de 10 y 20 μM sobre las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN en el estriado de la rata vieja.
4. Estudio del efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina a las dosis de 5, 10 y 20 μM sobre las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN en la corteza prefrontal de la rata adulta joven.
5. Estudio del efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina a las dosis de 10 y 20 μM sobre las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN en la corteza prefrontal de la rata de edad media.
6. Estudio del efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina a las dosis de 10 y 20 μM sobre las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN en la corteza prefrontal de la rata vieja.

Dado que la GLN es el precursor metabólico principal tanto del GLU como del

GABA, en todos los experimentos se analizó la concentración extracelular de GLN como índice del estado en el que se encuentra el metabolismo de ambos aminoácidos.

En estos experimentos, se usó la apomorfina, un agonista no selectivo de los receptores de DA, con el fin de imitar los efectos de la DA, ya que la apomorfina, de forma semejante a la DA, posee mayor

potencia sobre los receptores D2 que sobre los receptores D1 (ver Creese *et al.*, 1983). En todo caso, a las concentraciones usadas en nuestros experimentos, la apomorfina produce su efecto a través de la estimulación de ambos tipos de receptores, puesto que a concentraciones nanomolares actúa sólo sobre receptores D2, pero a concentraciones micromolares actúa sobre ambos receptores (Creese *et al.*, 1983).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Los animales utilizados en el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral fueron ratas adultas macho de raza Wistar de tres grupos de edad: ratas jóvenes, de 2 a 3 meses de edad y un peso comprendido entre los 230 y los 400 g (315 ± 6 g); ratas de edad media, de 11 a 14 meses de edad y un peso comprendido entre los 510 y los 745 g (615 ± 16 g); y ratas viejas de 24 a 34 meses de edad y un peso comprendido entre los 380 y los 845 g (604 ± 46 g de peso). Las ratas fueron suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Granada.

Durante la experimentación, los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un fotoperíodo de 12 h y una temperatura de 20-25 °C. La comida y la bebida fueron suministradas *ad libitum*.

2. MATERIAL

2.1. CONSTRUCCIÓN DE IMPLANTES PARA LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL *IN VIVO*

Los implantes empleados para la perfusión intracerebral *in vivo* constan de los siguientes elementos:

- dos cánulas de acero inoxidable de 0.90 mm (20 ga) de Ø externo, 0.66 mm de Ø interno y 10 mm de longitud, que se utilizan para guiar el sistema de cánulas *push-pull* (cánulas guía);
- dos cánulas de acero inoxidable de 0.63 mm (23 ga) de Ø externo y 10.2 mm de longitud, que se utilizan para cerrar las cánulas guía (obturador).

Una vez colocadas en paralelo y a la distancia adecuada, se unieron ambas cánulas guía mediante resina plástica Ivoclar. La distancia a la que se fijan las cánulas guía depende de la estructura cerebral a estudiar. Las cánulas guía bilaterales utilizadas en los experimentos de esta Tesis Doctoral se unieron a una distancia de 5 mm para los experimentos realizados en el estriado y de 1.8 mm para los experimentos realizados en la corteza prefrontal.

2.2. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE CÁNULAS *PUSH-PULL*

El material utilizado para la construcción de cada sistema de cánulas *push-pull* fue el siguiente:

Material y Métodos

- una cánula de acero inoxidable de 1.27 mm (18 ga) de \varnothing externo, 0.84 mm de \varnothing interno y 12 mm de longitud;
- una cánula de acero inoxidable de 0.63 mm (23 ga) de \varnothing externo, 0.33 mm de \varnothing interno y 20 mm de longitud;
- una cánula de acero inoxidable de 0.63 mm (23 ga) de \varnothing externo, 0.33 mm de \varnothing interno y 10 mm de longitud, con uno de sus extremos biselado;
- una cánula de acero inoxidable de 0.30 mm (30 ga) de \varnothing externo y 35 mm de longitud.

El sistema de cánulas *push-pull* se construye de la siguiente manera (ver Figura 6): se introduce la cánula de 30 ga o cánula *push* en el interior de la cánula de 23 ga y 20 mm de longitud o cánula *pull*. Entre los extremos distales de las cánulas *push* y *pull* debe existir una distancia de 0.3 mm con el fin de que la succión del líquido de perfusión y el arrastre de las sustancias liberadas sean óptimos. Este sistema concéntrico se introduce a su vez en una cánula de 18 ga y 12 mm de longitud. Por uno de los extremos de esta cánula de 18 ga sobresale el sistema concéntrico completo; por el extremo opuesto, por donde sobresale la cánula *push*, se introduce la cánula de 23 ga y 10 mm de longitud por su extremo biselado. Ambos extremos de la cánula de 18 ga se cierran con sendas soldaduras de estaño de modo que dicha cánula se convierte en una cámara perfectamente cerrada en la que el líquido que penetra en la cánula *pull* del sistema concéntrico es recogido por la cánula *pull* de extremo biselado.

El resultado final es un sistema de cánulas en el que el líquido de perfusión es introducido a través de la cánula *push* y recogido a través de la cánula *pull* (ver Figura 7).

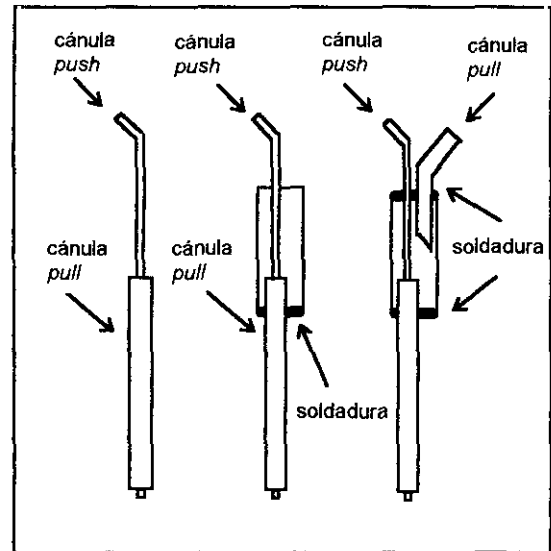


Fig. 6. Representación esquemática del proceso de construcción de las cánulas *push-pull*.

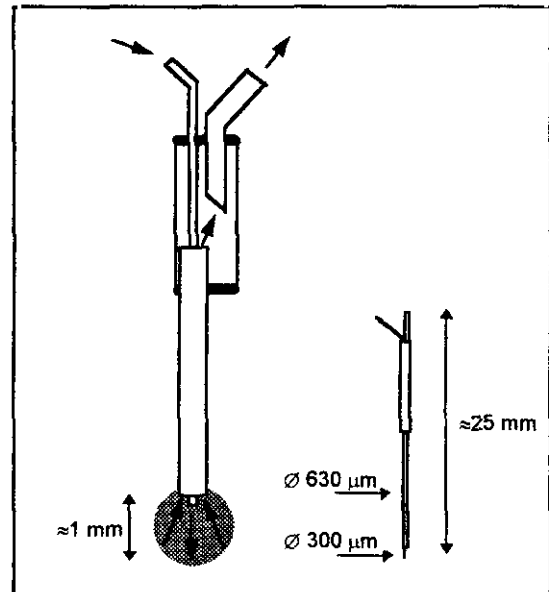


Fig. 7. Representación esquemática del funcionamiento de la cánula *push-pull*. El área sombreada representa el volumen cerebral perfundido. A la izquierda, dibujo a tamaño real de una cánula *push-pull*.

2.3. PREPARACIÓN DE EQUITHESIN

El anestésico Equithesin fue preparado en el laboratorio disolviendo 21.25 g de hidrato de cloral en 49.4 mL de etanol absoluto. Una vez obtenida dicha solución se añaden sucesivamente las siguientes soluciones:

- 4.86 g de pentobarbital sódico disueltos en 21 mL de agua bidestilada;
- 198 mL de 1,2-propilenglicol;
- 10.63 g de sulfato magnésico disueltos en 50 mL de agua bidestilada;
- agua bidestilada c.s.p. 500 mL.

La solución obtenida debe conservarse a temperatura ambiente.

3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO ESTEREOTÁXICO

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

- bisturí;
- destornillador de relojero;
- pinzas hemostáticas;
- resina plástica Ivoclar (International Dental Products);
- Espongostan Film (Ferrosan);
- tornillos de 1.4 mm de Ø;
- espátula recta;
- aguja de insulina;

- estereotáxico para roedores (David Kopf instruments 900);
- broca de 1 mm de Ø;
- motor porta brocas (Casali DSE-47).

El instrumental quirúrgico se mantuvo en una solución desinfectante de armil al 1 por mil durante toda la intervención.

Previamente a la operación, las ratas fueron pesadas y anestesiadas con Equithesin (ver preparación en el apartado 2.3 de Material y Métodos) vía intraperitoneal a la dosis de 2 mL/kg de peso. El animal se colocó en el estereotáxico pinzando el maxilar superior 4 mm por debajo de la línea interaural. Tras descubrir la calota mediante una incisión longitudinal y controlar con Espongostan las pequeñas hemorragias producidas, se localizó el punto Bregma. Bregma fue utilizado como referencia en la obtención de las coordenadas estereotáxicas anteroposterior y lateral necesarias para situar las cánulas guía.

Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para la localización de las cánulas guía fueron calculadas a partir del atlas estereotáxico de König y Klippel (1967). Para los implantes en el estriado las coordenadas fueron: 0.6 mm anterior y 2.5 mm lateral a Bregma. Para los implantes en la corteza prefrontal de las coordenadas fueron: 3.6 mm anterior y 0.9 mm lateral a Bregma.

Seguidamente se abrieron cuatro orificios en la calota, dos para el emplazamiento de los tornillos de fijación y otros dos para las cánulas guía. A continuación se localizó la superficie de la duramadre, tomándose ésta como referencia para la coordenada de profundidad. Posteriormente se rasgó superficialmente la duramadre con una aguja y se introdujo la cánula guía 1 mm por debajo de la superficie dural en el caso de los implantes en el estriado

Material y Métodos

y 0.5 mm de profundidad en el caso de los implantes en la corteza prefrontal.

El implante se fijó a la calota con resina plástica Ivoclar. Una vez que la resina hubo fraguado se introdujeron los obturadores en el interior de las cánulas guía.

Finalizada la operación se colocó al animal en su jaula vigilándole la ingesta de comida y bebida así como el peso durante los días siguientes a la intervención. Diariamente se movilizaron los obturadores, limpiándose con etanol al 70%, con el fin de mantener permeable la cánula guía.

3.2. PERFUSIÓN INTRACEREBRAL *IN VIVO*

La perfusión intracerebral *in vivo* se realizó utilizando el sistema de cánulas concéntricas o cánulas *push-pull* descrito en el apartado 2.2. de Material y Métodos. Este sistema permite la infusión de un líquido de perfusión en una estructura cerebral determinada a través de la cánula *push* y su posterior recogida, junto con las sustancias químicas liberadas, a través de la cánula *pull*. La técnica de perfusión intracerebral *in vivo push-pull* que se va a describir es una modificación de la publicada por Myers (1972) y ha sido utilizada rutinariamente en nuestro laboratorio (Mora y Porras, 1993; Porras y Mora, 1993; Sanz *et al.*, 1993; Expósito *et al.*, 1994; Segovia *et al.*, 1994).

El extremo superior de la cánula *push* se unió mediante un tubo de polietileno PE-10 a una jeringa Hamilton de 5 mL acoplada en una bomba de infusión Harvard 22. El extremo superior de la cánula *pull* biselada se unió a un polietileno PE-50 cuyo extremo opuesto quedó acoplado en un colector de fracciones Jaytee 5512 (ver Figura 8). El colector de fracciones se colocó por debajo del punto de perfusión a una distancia tal que la infusión y la recogida de líquido se realizaron al mismo flujo y simultáneamente.

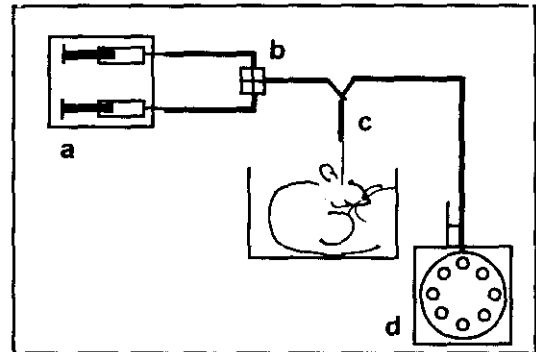


Fig. 8. Representación esquemática del sistema completo utilizado para la realización de los experimentos mediante la técnica de *push-pull* continuo. (a) Bomba de infusión; (b) válvula de cuatro vías; (c) animal de experimentación con la cánula *push-pull*; (d) colector de fracciones.

Las perfusiones intracerebrales *in vivo* se realizaron de dos a cuatro días después de la intervención quirúrgica. Tras retirar el obturador, la cánula *push-pull* se introdujo de forma que su extremo inferior quedó 4 mm ó 2.5 mm por debajo de la superficie dural en los experimentos realizados en el estriado y en la corteza prefrontal respectivamente (ver Figura 9).

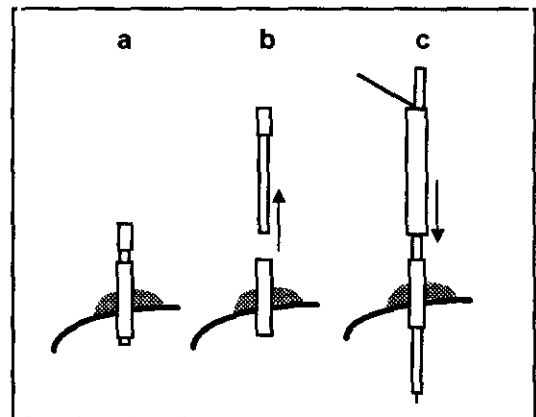


Fig. 9. Dibujo esquemático de la cánula guía implantada en la calota del animal con el obturador introducido (a). Para iniciar la perfusión intracerebral, se retira el obturador de la cánula guía (b) y se introduce la cánula *push-pull* (c).

El líquido de perfusión utilizado fue líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs) preparado previamente en el laboratorio. La composición del LCRs fue la siguiente: NaCl: 122.0 mM; KCl: 3 mM; CaCl₂: 1.2 mM; KH₂PO₄: 0.4 mM; NaHCO₃: 25 mM; MgSO₄·7H₂O: 12 mM y glucosa: 5.9 mM (pH=7.8). Antes de comenzar la perfusión, se filtró el LCRs un filtro Millipore de 0.22 mm de diámetro de poro y se almacenó en un frasco. Los filtros y los frascos fueron esterilizados previamente en un autoclave.

La perfusión se realizó de forma continua a un flujo de 20 µL/min durante 150 min. El tiempo de recolección de cada muestra fue de 10 min. En estudios previos de nuestro laboratorio se ha comprobado que, con esta técnica, los niveles de aminoácidos se estabilizan tras 50 min de perfusión continua (Porras, 1992), por lo cual las muestras recogidas durante los 50 primeros min de perfusión no se analizaron en los sucesivos experimentos. Tras la obtención de niveles estables de aminoácidos se recogieron cinco muestras (50 min) para determinar los niveles basales de aminoácidos (*muestras basales*). Durante la recogida de la sexta muestra (entre el min 50 y el min 60) y mediante el giro de la llave de una válvula Harvard HV 4-4 de cuatro vías se infundió la apomorfina (*muestras estímulo*). Posteriormente, mediante un nuevo giro de la llave de la válvula Harvard HV 4-4, la perfusión se continuó con LCRs durante 40 min (*muestras postestímulo*).

La apomorfina se infundió directamente sobre la estructura en estudio disuelta en LCRs. La solución de apomorfina se preparó de 10 a 30 min antes de utilizarla en cada experimento. Además, con el fin de evitar la degradación de la apomorfina se añadió a la disolución ácido ascórbico a una concentración de 0.4 µM.

La apomorfina se utilizó a las dosis de 5, 10 y 20 µM en los experimentos con ratas

jóvenes y a las dos dosis superiores en los experimentos con ratas de edad media y viejas.

Los perfundidos obtenidos se hicieron pasar a través de un filtro Millipore de 0.22 mm. Inmediatamente después las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

3.3. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Todos los perfundidos fueron analizados en un cromatógrafo Waters 600E acoplado a un detector de fluorescencia Waters 420-AC. Se utilizó una precolumna Resolve C₁₈ (Waters) seguida de una columna de fase inversa Resolve C₁₈ (Waters) de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro, 5 mm de tamaño de partícula y 90 Å de diámetro de poro.

3.3.1. Cuantificación de aminoácidos como OPA-derivados

Para la detección y cuantificación de los aminoácidos presentes en las muestras recogidas se realizó una derivación precolumna con el reactivo o-ftaldialdehído-3-mercaptopropiónico (OPA-3-mercaptopropiónico) de acuerdo con el método descrito por Jones *et al.* (1981) y modificado por Herranz *et al.* (1985). Este método se ha venido utilizando en nuestro laboratorio, con pequeñas modificaciones, de forma rutinaria (Cobo, 1990; Cobo *et al.*, 1992, 1993; Expósito *et al.*, 1994; Segovia *et al.*, 1994).

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

- borato sódico (Na₂B₄O₇·10H₂O) (Merck);
- metanol grado HPLC (Scharlau);
- o-ftaldialdehído (OPA) (Sigma);

Material y Métodos

- ácido 3-mercaptopropiónico (Sigma).

El reactivo se prepara del siguiente modo: tras disolver 32 mg de OPA en 800 μ L de metanol se añaden 7140 μ L de una solución de tampón borato 0.1 M ajustada a un pH de 9.5. Posteriormente se añaden 54 μ L de ácido 3-mercaptopropiónico. La solución debe conservarse a temperatura ambiente en un frasco opaco y cerrado. El reactivo preparado posee una validez de 15 días.

La derivación precolumna de los aminoácidos fue realizada de la siguiente manera. A 20 μ L de muestra se le incorporaron 5 μ L del estándar interno utilizado (homoserina 0.025 mM) y 10 μ L del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico. La mezcla resultante se agitó en un aparato *vortex* durante 15 seg para favorecer la reacción. Transcurrido 1 min desde la adición del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico a la muestra, se añadieron 5 μ L de ácido acético al 5% con el fin de disminuir el pH de la mezcla y evitar la pérdida de sílice de la columna. Finalizada la derivación, se inyectaron en el cromatógrafo 20 μ L de la solución obtenida mediante un inyector tipo Reodhyme de volumen fijo.

3.3.2. Condiciones cromatográficas

Para conseguir una correcta separación de los picos correspondientes a cada aminoácido se empleó un gradiente de dos fases móviles, con un flujo constante de entrada a la columna de 1 mL/min (Herranz *et al.*, 1985). El programa de gradientes utilizado puede verse en la Tabla 1.

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

- tampón acetato sódico 4 M (Pierce);
- alcohol isopropílico grado HPLC (Scharlau);

- metanol grado HPLC (Scharlau);
- agua ultrapura obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q plus (Millipore) y filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m.

La fase móvil A consistió en una solución 95/5 (vol/vol) de tampón acetato sódico 50 mM y metanol, a la que se le añadieron 12.5 mL de alcohol isopropílico por cada litro de mezcla. El tampón acetato sódico utilizado en la fase móvil A se preparó a partir de una solución de acetato sódico 4 M con pH ajustado a 5.67 y filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m.

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

Previamente a su utilización, ambas soluciones se degasificaron mediante sonicación durante 15 min. Posteriormente se colocaron en el cromatógrafo y durante 5 min se sometieron a un burbujeo de helio a un flujo de 100 mL/min. Durante el proceso de análisis el flujo de helio se mantuvo a 10 mL/min.

TIEMPO (min)	FLUJO (mL/min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0.00	1	90	10
9.00	1	52	48
12.00	1	0	100
16.00	1	0	100
16.01	1	90	10
20.00	1	90	10

Tabla 1. Programa de gradientes utilizado en el análisis cromatográfico de las muestras. Los 16 primeros min de este programa de gradientes fueron usados para el análisis de las muestras; los 4 min siguientes fueron usados como programa de preparación para un nuevo análisis.

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

El cálculo de factores de respuesta y tiempos de retención y la cuantificación de los aminoácidos se llevó a cabo con un integrador registrador Waters 745 siguiendo el método del estándar interno. El estándar interno empleado fue la homoserina. En la Figura 10 puede verse un ejemplo de cromatogramas obtenidos con las condiciones descritas.

3.2.2.1. Factor de dilución

El hecho de realizar una derivación precolumna de la muestra o de la solución patrón obliga a calcular un factor de dilución que tenga en cuenta el volumen de muestra que se encuentra en la mezcla inyectada. La preparación de la muestra se hizo, tal y como se mencionó previamente, añadiendo a los 20 μL de muestra o solución patrón, 5 μL de estándar interno, 10 μL de OPA-3-mercaptopropiónico y 5 μL de ácido acético al 5%. El volumen final de la mezcla fue, por tanto, de 40 μL . De estos 40 μL se inyectaron 20 μL en el cromatógrafo. El volumen total de muestra inyectado fue, por tanto, de 10 μL . El factor de dilución se calculó hallando la inversa del volumen de muestra inyectado, resultando ser de $1/10 = 0.1$. La concentración de cada aminoácido presente en la muestra se calculó multiplicando la cantidad medida de dicho aminoácido por el factor de dilución 0.1.

3.2.2.2. Calibración

La calibración se realiza con el fin de dar al integrador valores de referencia de los tiempos de retención y factores de respuesta de cada aminoácido analizado. El tiempo de retención de cada sustancia es el tiempo medio que tarda en salir de la columna del cromatógrafo y es

utilizado por el integrador para identificarla. El factor de respuesta de cada sustancia es un valor que relaciona las concentraciones conocidas de esta sustancia y del estándar interno con las áreas de los picos cromatográficos.

Para la calibración del cromatógrafo, se prepararon soluciones estándar de cada uno de los aminoácidos analizados a una concentración de 0.05 mM. El disolvente empleado en todas las disoluciones fue LCRs. Los aminoácidos empleados fueron L-GLU, GABA, GLN y HL-homoserina (Sigma).

A partir de las soluciones estándar se preparó una solución patrón mezclando 150 μL de la solución estándar de cada aminoácido, excluido el estándar interno (homoserina). Las soluciones patrón así obtenidas se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

La calibración se realizó inyectando en el cromatógrafo 5 partes alícuotas de solución patrón. La inyección de la misma muestra varias veces permite al integrador registrador Waters 745 calcular los factores de respuesta y los tiempos de retención medios para cada aminoácido. En la Tabla 2 se recogen los datos obtenidos de una de las calibraciones realizadas para el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral.

3.2.2.3 Coeficiente de variación

Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectaron en el cromatógrafo 7 partes alícuotas de una solución patrón con concentraciones de 5 mM de cada aminoácido. Puesto que estas inyecciones fueron realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas son reflejo de la variabilidad propia del método. En la Tabla 2 puede observarse el coeficiente de variación de cada aminoácido obtenido durante el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral.

Material y Métodos

AMINOÁCIDO	FR	TR	CV
Ácido glutámico	1.014	5.04	3.18 %
Glutamina	1.170	7.31	1.11%
Homoserina	-	8.25	-
GABA	1.119	14.34	2.45 %

Tabla 2. Factores de respuesta (FR), tiempos de retención (TR) y coeficiente de variación (CV) obtenidos en una de las calibraciones realizadas durante el trabajo experimental realizado para esta Tesis Doctoral.

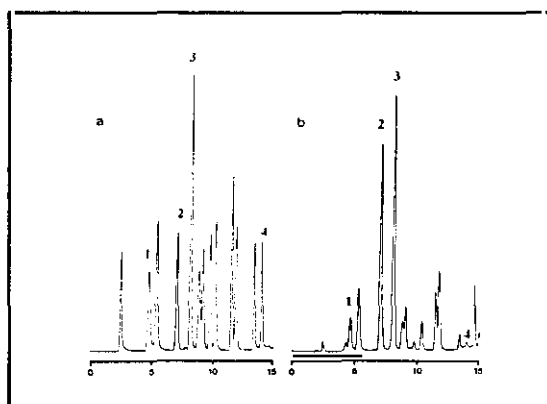


Fig. 10. Ejemplo de cromatogramas obtenidos con las condiciones cromatográficas descritas en el texto: a) patrón; b) muestra obtenida de un animal mediante perfusión intracerebral in vivo. La escala representa el tiempo de análisis (en min). 1: GLU; 2: GLN; 3: homoserina; 4: GABA.

3.2.2.4. Linealidad del análisis cromatográfico

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico descrito se inyectaron en el cromatógrafo soluciones patrón con una concentración constante de homoserina (5 μ L de homoserina 0.025 mM = 62.5 pmoles) y concentraciones variables de los aminoácidos a analizar. La representación gráfica de la relación entre el área de cada aminoácido y el área del estándar interno en el eje de ordenadas

y de la concentración de aminoácido en el eje de abscisas resultó ajustarse a una línea recta (ver Figura 11).

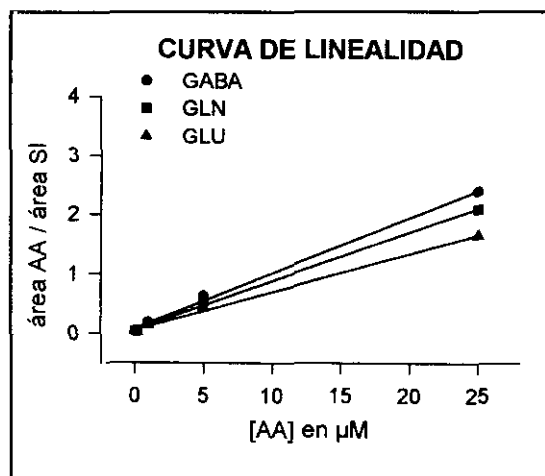


Fig. 11. Curva de linealidad obtenida para los aminoácidos GLU, GABA y GLN bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto.

3.4. COMPROBACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LAS CÁNULAS

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

El material empleado para dicha comprobación fue el siguiente:

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

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de 2 mL/Kg de Equithesin (ver composición en el apartado 2.3 de Material y Métodos). A continuación se les

infundió solución salina isotónica (NaCl 0.9%) con heparina al 1%, seguida de una solución de formaldehído al 10% a través de un punción en el ventrículo izquierdo. Terminada la infusión, se extrajeron los cerebros con unos alicates planos y se mantuvieron a -4 °C sumergidos en una solución de formaldehído al 10%.

Para su estudio macroscópico los cerebros fueron colocados en un microtomo de congelación y se cortaron en secciones de 150 µm. A continuación se comprobó la localización adecuada de las cánulas guía implantadas y del área de perfusión utilizando una lupa binocular.

4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis de los resultados obtenidos se consideraron como valores control de cada grupo la media de los cinco valores obtenidos

antes de la aplicación de la apomorfina. Estos valores control reflejan la concentración de aminoácidos de cada grupo obtenida en condiciones basales.

Los valores control de los tres grupos de edad en cada una de las estructuras se compararon utilizando un análisis de la varianza de una vía.

Los resultados obtenidos en los grupos de animales de diferente edad tras la estimulación con apomorfina se analizaron utilizando un diseño factorial de tres vías en el que las vías fueron las dosis de apomorfina utilizadas (10 y 20 µM), el grupo de edad de los animales (jóvenes, de edad media y viejos) y el tiempo (10 muestras). El diseño factorial se hizo con medidas repetidas en el tiempo, comparando los valores estímulo y post-estímulo con el valor control.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados para esta Tesis Doctoral se presentan en forma de Tablas y Gráficas. Las Tablas muestran, en valores absolutos, las concentraciones extracelulares de los aminoácidos analizados (en μM las de GLU y GLN, en nM las de GABA). Las Gráficas muestran dichas concentraciones en porcentajes con respecto a su valor control (la media de los valores de las cinco muestras basales).

Todos los resultados mostrados pertenecen a experimentos en los que se comprobó que el área de perfusión estaba localizada en el estriado o en la corteza prefrontal de la rata en estudio.

1. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO: ESTUDIOS EN EL ESTRIADO

1.1. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en el estriado de la rata adulta joven

La concentración extracelular de GLU obtenida en el estriado de la rata adulta joven

en condiciones basales fue, con nuestro método, de $0.24 \pm 0.02 \mu\text{M}$.

La aplicación directa del agonista dopaminérgico apomorfina en el estriado de ratas jóvenes produjo un aumento de la concentración extracelular de GLU dependiendo de la dosis utilizada.

A la dosis de $5 \mu\text{M}$, la apomorfina no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GLU en el estriado de ratas jóvenes. El incremento máximo alcanzó el 136% del valor control ($P > 0.10$). Sin embargo, a dosis de 10 y $20 \mu\text{M}$, la apomorfina produjo un aumento de la concentración extracelular de GLU que comenzó durante la aplicación de la misma y se mantuvo durante 30 min. El aumento máximo de la concentración de GLU alcanzó el 167% del valor control con la dosis de $10 \mu\text{M}$ ($P < 0.005$) y el 184% del valor control con la dosis de $20 \mu\text{M}$ ($P < 0.001$).

1.2. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en el estriado de la rata de edad media

La concentración extracelular de GLU obtenida en el estriado de la rata de edad media

Resultados

en condiciones basales fue, con nuestro método, de $0.30 \pm 0.03 \mu\text{M}$.

En las ratas de edad media, la aplicación de apomorfina a la dosis de $10 \mu\text{M}$ produjo un aumento de la concentración extracelular de GLU sólo en la muestra posterior a la aplicación de apomorfina. Este aumento alcanzó el 171% del valor control ($P < 0.005$). Por el contrario, la apomorfina, a la dosis de $20 \mu\text{M}$, no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GLU en el estriado de ratas de edad media. El incremento máximo alcanzó el 124% del valor control ($P > 0.10$).

1.3. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en el estriado de la rata vieja

La concentración extracelular de GLU obtenida en el estriado de la rata vieja en condiciones basales fue, con nuestro método, de $0.26 \pm 0.04 \mu\text{M}$.

En las ratas viejas, la aplicación de apomorfina, a las dosis de 10 y $20 \mu\text{M}$, no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GLU en el estriado. Los aumentos máximos alcanzados fueron del 121% del valor control con la dosis de $10 \mu\text{M}$ ($P > 0.10$) y del 136% del valor control con la dosis de $20 \mu\text{M}$ ($P > 0.10$).

1.4. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en el estriado de la rata a lo largo del envejecimiento

La concentración extracelular de GLU en el estriado de la rata en condiciones basales no fue significativamente diferente entre los tres grupos de edad ($P > 0.10$).

El efecto de la apomorfina, a la dosis de $10 \mu\text{M}$, sobre las concentraciones extracelulares de GLU fue significativamente menor en el grupo de ratas viejas que en los grupos de ratas jóvenes y de edad media ($P < 0.01$).

El efecto de la apomorfina, a la dosis de $20 \mu\text{M}$, sobre las concentraciones extracelulares de GLU fue significativamente diferente entre los tres grupos de edad ($p < 0.05$). Sin embargo, las comparaciones dos a dos no resultaron estadísticamente significativas.

Grupo de edad	GLUTAMATO (estriado)
2-3 meses (n=15)	0.24 ± 0.02
12-13 meses (n=11)	0.30 ± 0.03
24-34 meses (n=13)	0.26 ± 0.04

Tabla 3. Concentraciones extracelulares de ácido glutámico (en μM , media \pm error estándar de la media) obtenidas en condiciones basales del estriado de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas.

1.5. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en el estriado de la rata adulta joven

La concentración extracelular de GABA obtenida en el estriado de la rata adulta joven en condiciones basales fue, con nuestro método, de $40 \pm 7 \text{ nM}$.

La aplicación directa del agonista dopaminérgico apomorfina en el estriado de ratas jóvenes produjo un aumento de la concentración extracelular de GABA dependiendo de la dosis utilizada.

A la dosis de $5 \mu\text{M}$, la apomorfina no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GABA en el estriado de ratas jóvenes. El incremento máximo alcanzó el 146% del valor control ($P > 0.10$). Por el contrario, a las dosis de 10 y $20 \mu\text{M}$, la apomorfina sí produjo un aumento de la concentración extracelular de GABA. Con la dosis de $10 \mu\text{M}$ de apomorfina, el

aumento en la concentración de GABA se observó durante la aplicación de la apomorfina y alcanzó el 178% del valor control ($P < 0.005$). Con la dosis de 20 μM de apomorfina, el aumento en la concentración de GABA comenzó durante la aplicación de la apomorfina y se mantuvo durante 30 min, alcanzando su máximo valor durante la aplicación de la apomorfina (191% del valor control) ($P < 0.005$).

1.6. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en el estriado de la rata de edad media

La concentración extracelular de GABA obtenida en el estriado de la rata de edad media en condiciones basales fue, con nuestro método, de 50 ± 7 nM.

En las ratas de edad media, la aplicación de apomorfina, a las dosis de 10 y 20 μM , produjo un aumento en la concentración extracelular de GABA sólo en la muestra posterior a la aplicación de la apomorfina. Este incremento alcanzó el 175% ($P < 0.05$) y el 167% ($P < 0.05$) del valor control respectivamente.

1.7. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en el estriado de la rata vieja

La concentración extracelular de GABA obtenida en el estriado de la rata vieja en condiciones basales fue, con nuestro método, de 43 ± 7 nM.

En las ratas viejas, la aplicación de apomorfina, a la dosis de 10 μM , no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GABA en el estriado. El incremento máximo alcanzó el 126% del valor control ($P > 0.10$). Sin embargo, la apomorfina a la dosis de 20 μM , produjo un aumento de la concentración extracelular de

GABA durante su aplicación. Este aumento alcanzó el 172% del valor control ($P < 0.01$).

1.8. Efecto de la apomorfina sobre la concentración de GABA en el estriado de la rata a lo largo del envejecimiento

La concentración extracelular de GABA en el estriado de la rata en condiciones basales no se diferenció de forma significativa entre los tres grupos de edad ($P > 0.10$).

El efecto de la apomorfina, a la dosis de 10 μM , sobre las concentraciones extracelulares de GABA fue significativamente menor en el grupo de ratas viejas con respecto a los grupos de ratas jóvenes y de edad media ($P < 0.01$).

El efecto de la apomorfina, a la dosis de 20 μM , sobre las concentraciones extracelulares de GABA no fue significativamente diferente entre los tres grupos de edad.

Grupo de edad	GABA (estriado)
2-3 meses (n=17)	40 ± 7
12-13 meses (n=10)	50 ± 7
24-34 meses (n=12)	43 ± 7

Tabla 4. Concentraciones extracelulares de GABA (en nM, media \pm error estándar de la media) obtenidas en condiciones basales del estriado de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas.

1.9. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLN en el estriado de la rata a lo largo del envejecimiento

Las concentraciones extracelulares de GLN obtenidas en el estriado de la rata en condiciones basales fueron, con nuestro método, las

Resultados

siguientes: en el grupo de ratas adultas jóvenes, $1.25 \pm 0.12 \mu\text{M}$; en el grupo de ratas de mediana edad, $1.08 \pm 0.08 \mu\text{M}$; y en el grupo de ratas viejas, $1.20 \pm 0.16 \mu\text{M}$. La concentración extracelular de GLN en el estriado de la rata en condiciones basales no se diferenció de forma significativa entre los tres grupos de edad ($P > 0.10$).

La aplicación de apomorfina, a las dosis de 5, 10 y 20 μM , no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GLN en el estriado de la rata en ninguno de los grupos de edad estudiados.

Grupo de edad	GLUTAMINA (estriado)
2-3 meses (n=17)	1.25 ± 0.12
12-13 meses (n=10)	1.08 ± 0.08
24-34 meses (n=13)	1.20 ± 0.16

Tabla 5. Concentraciones extracelulares de glutamina (en μM , media \pm error estándar de la media) obtenidas en condiciones basales del estriado de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas.

Resultados

ÁCIDO GLUTÁMICO (estriado)							
	ratas adultas jóvenes			ratas de edad media		ratas viejas	
min	APO 5 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=6)	APO 20 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=8)	APO 20 μ M (n=5)
10	0.21 \pm 0.04	0.29 \pm 0.08	0.20 \pm 0.03	0.33 \pm 0.04	0.31 \pm 0.09	0.27 \pm 0.07	0.27 \pm 0.08
20	0.22 \pm 0.02	0.25 \pm 0.06	0.22 \pm 0.03	0.36 \pm 0.04	0.27 \pm 0.10	0.24 \pm 0.04	0.34 \pm 0.18
30	0.24 \pm 0.03	0.25 \pm 0.04	0.25 \pm 0.04	0.31 \pm 0.07	0.26 \pm 0.09	0.21 \pm 0.04	0.34 \pm 0.18
40	0.21 \pm 0.02	0.26 \pm 0.06	0.21 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03	0.33 \pm 0.13	0.28 \pm 0.11	0.25 \pm 0.06
50	0.23 \pm 0.04	0.28 \pm 0.04	0.23 \pm 0.34	0.28 \pm 0.06	0.27 \pm 0.06	0.21 \pm 0.05	0.29 \pm 0.10
60	0.30 \pm0.06	0.44 \pm0.11 ***	0.37 \pm0.06 ***	0.26 \pm0.06	0.26 \pm0.06	0.21 \pm0.06	0.30 \pm0.10
70	0.28 \pm 0.05	0.42 \pm 0.04 ***	0.40 \pm 0.08 ****	0.50 \pm 0.17 ***	0.22 \pm 0.05	0.26 \pm 0.08	0.35 \pm 0.14
80	0.21 \pm 0.06	0.42 \pm 0.09 ***	0.36 \pm 0.08 ***	0.39 \pm 0.08	0.33 \pm 0.04	0.23 \pm 0.04	0.28 \pm 0.06
90	0.19 \pm 0.03	0.28 \pm 0.07	0.27 \pm 0.04	0.39 \pm 0.03	0.24 \pm 0.05	0.29 \pm 0.08	0.22 \pm 0.06
100	0.16 \pm 0.03	0.39 \pm 0.10	0.20 \pm 0.03	0.26 \pm 0.06	0.25 \pm 0.04	0.24 \pm 0.06	0.29 \pm 0.11

Tabla 6. Concentraciones extracelulares de ácido glutámico (en μ M, media \pm error estándar de la media) obtenidas mediante perfusión intracerebral en el estriado de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas. Durante la obtención de la sexta muestra (min 60) se administra intracerebralmente el agonista dopaminérgico apomorfina (APO) a las dosis de 5, 10 ó 20 μ M. Los asteriscos indican la significación estadística de cada valor con respecto a su valor control (***) = $P < 0.005$; **** = $P < 0.001$).

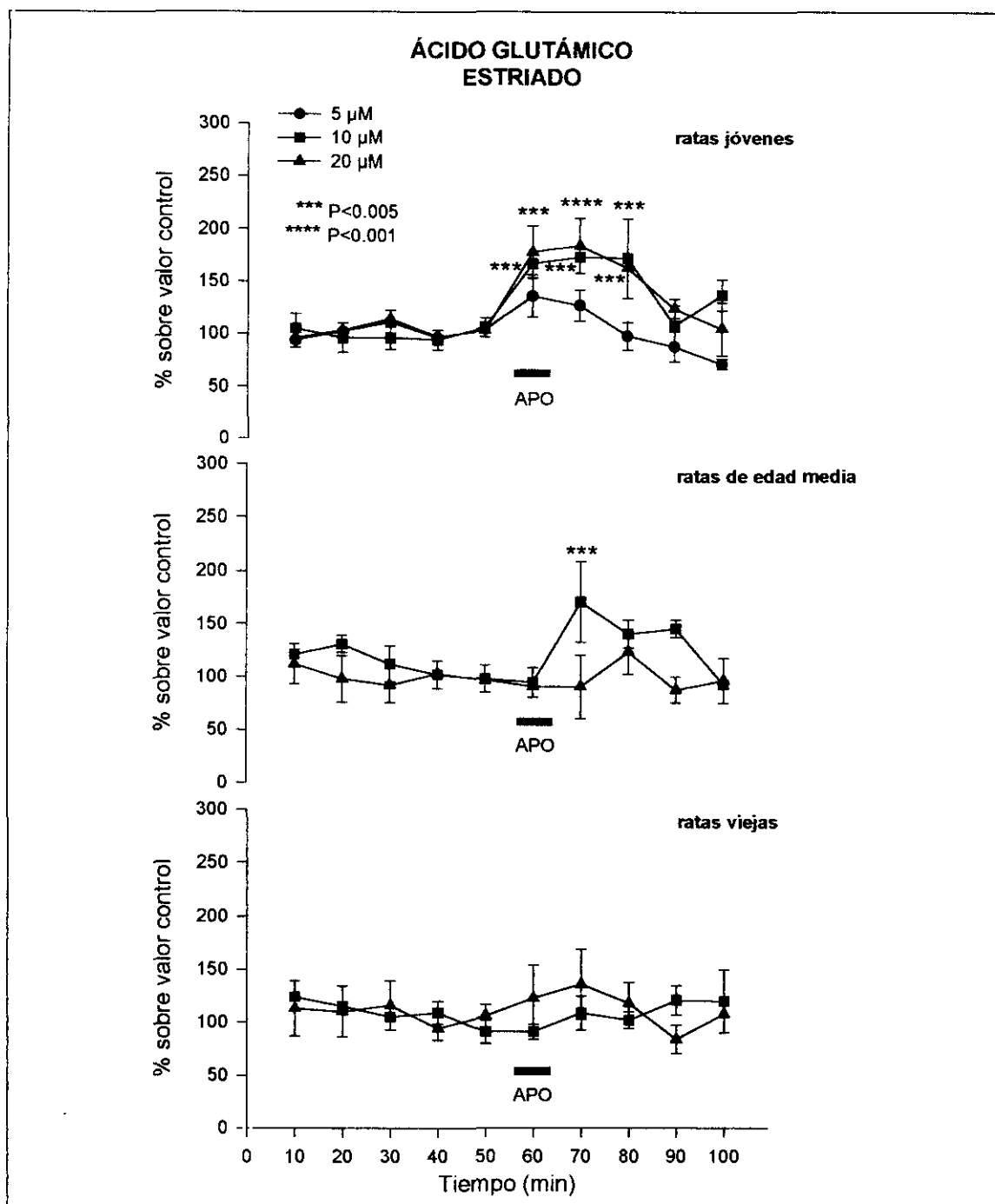


Fig. 12. Efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina (APO), a las dosis de 5, 10 y 20 μM , sobre la concentración extracelular de ácido glutámico en el estriado de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

Resultados

GABA (estriado)							
ratas adultas jóvenes			ratas de edad media		ratas viejas		
min	APO 5 μ M (n=4)	APO 10 μ M (n=7)	APO 20 μ M (n=6)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=7)	APO 20 μ M (n=5)
10	25 \pm 4	50 \pm 14	39 \pm 9	40 \pm 12	69 \pm 16	56 \pm 20	41 \pm 11
20	26 \pm 8	47 \pm 17	43 \pm 10	34 \pm 9	52 \pm 7	43 \pm 6	42 \pm 10
30	29 \pm 2	49 \pm 15	44 \pm 9	48 \pm 12	50 \pm 7	41 \pm 7	34 \pm 12
40	26 \pm 7	45 \pm 11	37 \pm 11	50 \pm 13	58 \pm 7	48 \pm 10	35 \pm 9
50	24 \pm 2	47 \pm 10	42 \pm 11	42 \pm 13	58 \pm 9	41 \pm 6	45 \pm 13
60	36 \pm 8	78 \pm 16 ***	75 \pm 23 ***	58 \pm 19	54 \pm 9	51 \pm 8	61 \pm 14 **
70	31 \pm 9	58 \pm 10	72 \pm 26 **	80 \pm 27 *	87 \pm 26 *	43 \pm 6	53 \pm 15
80	29 \pm 7	56 \pm 17	69 \pm 24 **	57 \pm 17	53 \pm 11	32 \pm 10	49 \pm 12
90	33 \pm 11	54 \pm 20	46 \pm 10	47 \pm 9	51 \pm 9	34 \pm 5	41 \pm 11
100	26 \pm 6	59 \pm 22	47 \pm 12	25 \pm 2	53 \pm 11	39 \pm 11	43 \pm 11

Tabla 7. Concentraciones extracelulares de GABA (en nM, media \pm error estándar de la media) obtenidas mediante perfusión intracerebral en el estriado de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas. Durante la obtención de la sexta muestra (min 60) se administra intracerebralmente el agonista dopaminérgico apomorfina (APO) a dosis de 5, 10 ó 20 μ M. Los asteriscos indican la significación estadística de cada valor con respecto a su valor control (* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.005$).

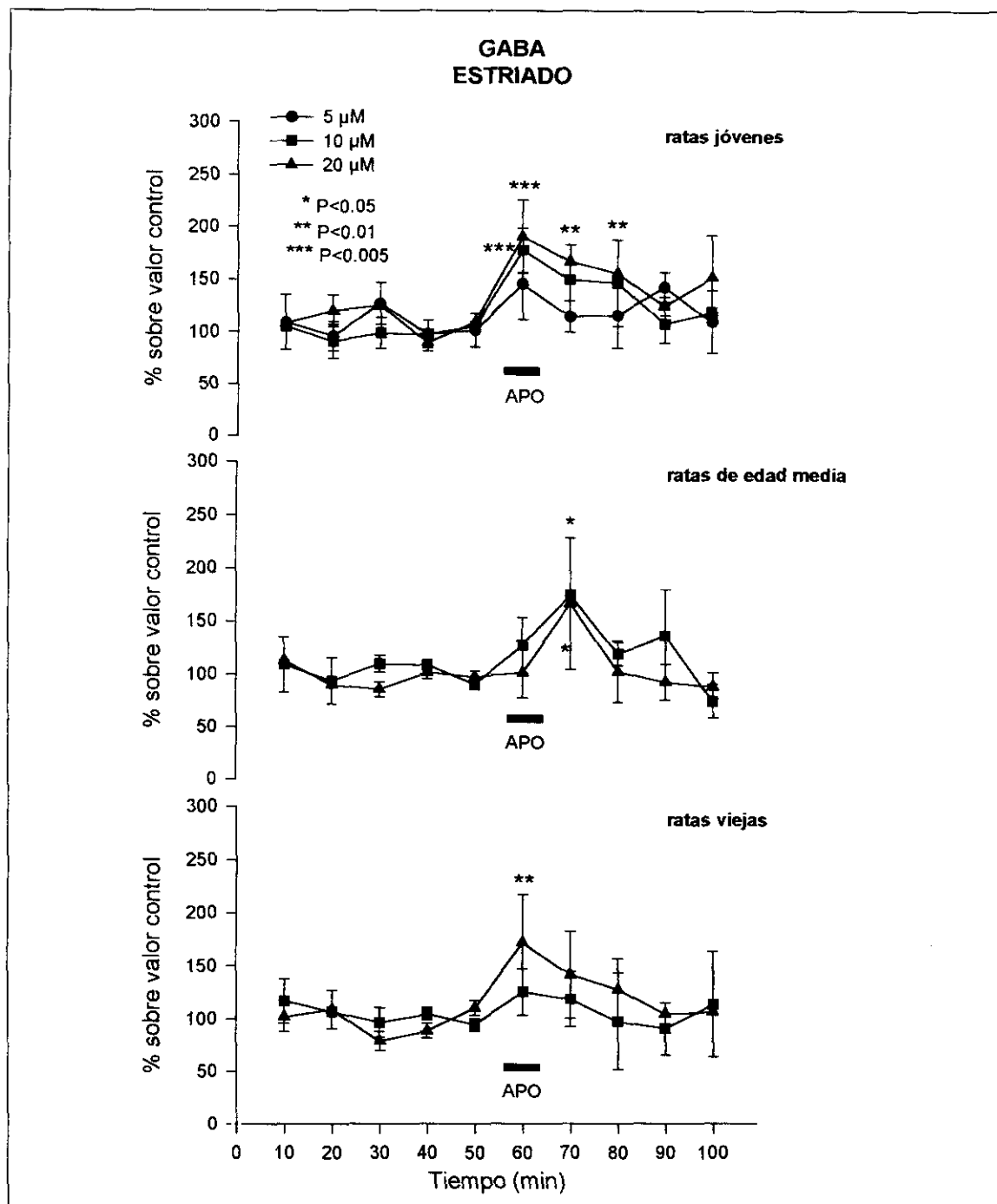


Fig. 13. Efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina (APO), a las dosis de 5, 10 y 20 μ M, sobre la concentración extracelular de GABA en el estriado de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

Resultados

GLUTAMINA (estriado)							
min	ratas adultas jóvenes			ratas de edad media		ratas viejas	
	APO 5 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=7)	APO 20 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=8)	APO 20 μ M (n=5)
10	0.86 \pm 0.13	1.33 \pm 0.23	1.52 \pm 0.18	1.06 \pm 0.26	1.18 \pm 0.17	1.27 \pm 0.29	1.16 \pm 0.43
20	1.04 \pm 0.14	1.20 \pm 0.15	1.78 \pm 0.38	1.14 \pm 0.28	1.03 \pm 0.08	1.29 \pm 0.34	1.54 \pm 0.90
30	1.04 \pm 0.15	0.92 \pm 0.10	1.47 \pm 0.25	1.01 \pm 0.22	1.05 \pm 0.10	0.95 \pm 0.18	1.14 \pm 0.31
40	1.18 \pm 0.32	1.10 \pm 0.13	1.64 \pm 0.30	1.06 \pm 0.25	1.31 \pm 0.21	1.42 \pm 0.49	1.22 \pm 0.50
50	1.18 \pm 0.17	1.12 \pm 0.13	1.59 \pm 0.46	1.24 \pm 0.14	1.28 \pm 0.15	0.96 \pm 0.25	1.17 \pm 0.28
60	1.30 \pm0.14	1.09 \pm0.10	1.33 \pm0.25	0.54 \pm0.06	1.23 \pm0.13	1.17 \pm0.34	1.32 \pm0.33
70	1.17 \pm 0.21	0.96 \pm 0.13	1.72 \pm 0.64	0.76 \pm 0.22	1.59 \pm 0.30	1.43 \pm 0.71	1.51 \pm 0.43
80	1.30 \pm 0.31	1.06 \pm 0.11	1.39 \pm 0.44	0.78 \pm 0.25	1.47 \pm 0.21	1.19 \pm 0.48	1.96 \pm 0.77
90	1.17 \pm 0.25	1.04 \pm 0.12	1.21 \pm 0.11	0.59 \pm 0.17	1.45 \pm 0.23	0.97 \pm 0.21	1.91 \pm 0.70
100	1.31 \pm 0.24	0.96 \pm 0.10	1.23 \pm 0.26	0.62 \pm 0.13	0.98 \pm 0.04	1.11 \pm 0.18	1.67 \pm 0.54

Tabla 8. Concentraciones extracelulares de glutamina (en μ M, media \pm error estándar de la media) obtenidas mediante perfusión intracerebral en el estriado de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas. Durante la obtención de la sexta muestra (min 60) se administra intracerebralmente el agonista dopaminérgico apomorfina (APO) a dosis de 5, 10 ó 20 μ M.

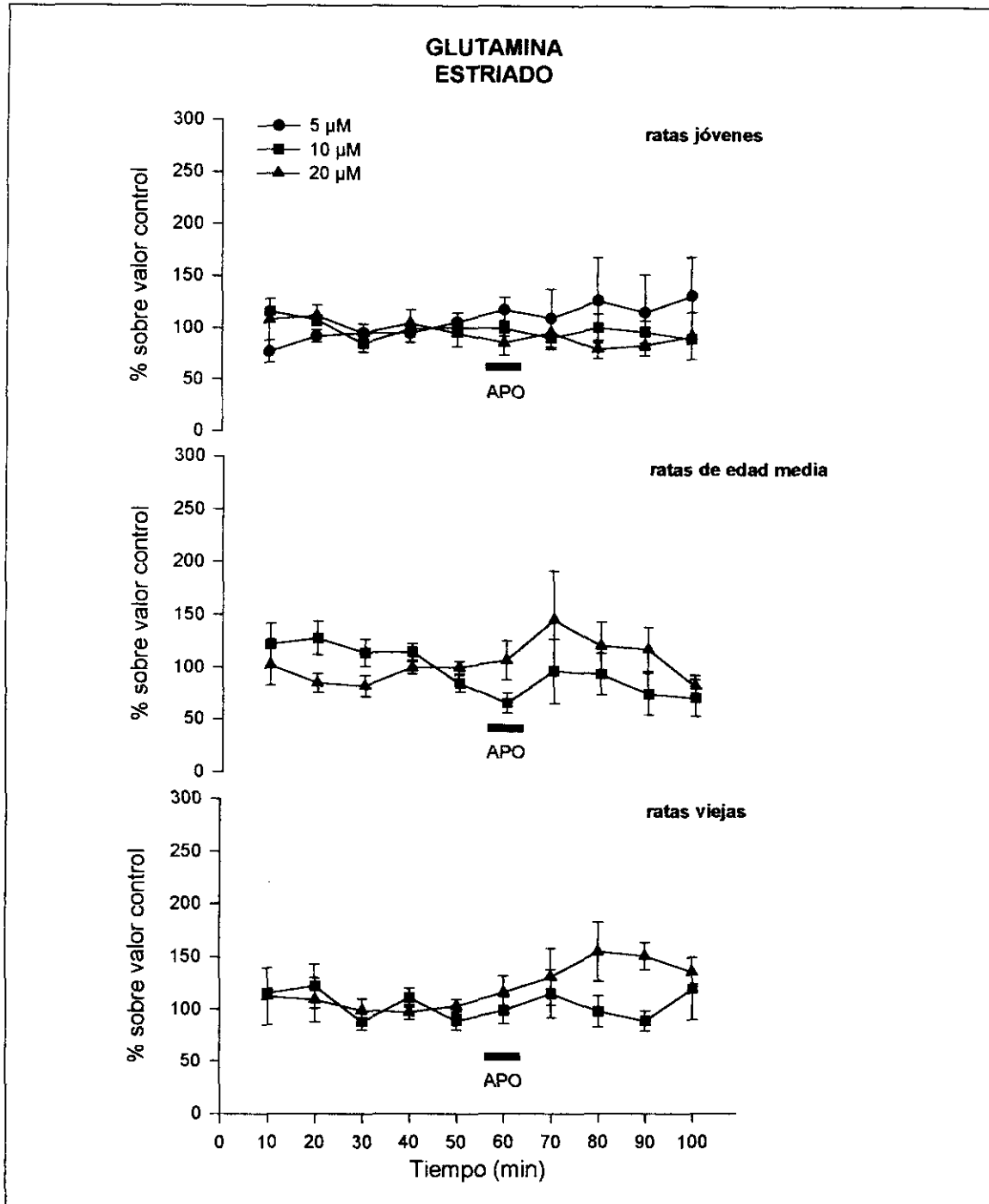


Fig. 14. Efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina (APO), a las dosis de 5, 10 y 20 μM, sobre la concentración extracelular de glutamina en el estriado de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

Resultados

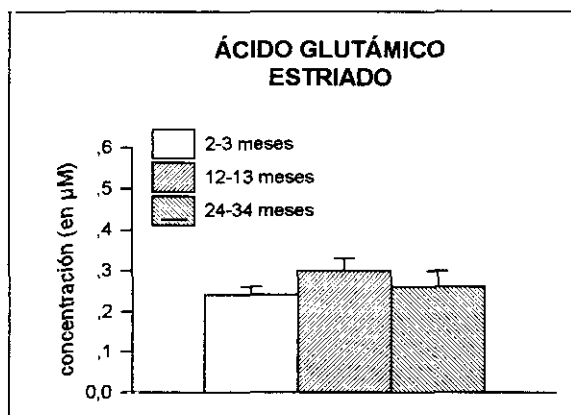


Fig. 15. Concentraciones extracelulares de ácido glutámico obtenidas en condiciones basales en el estradiol de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

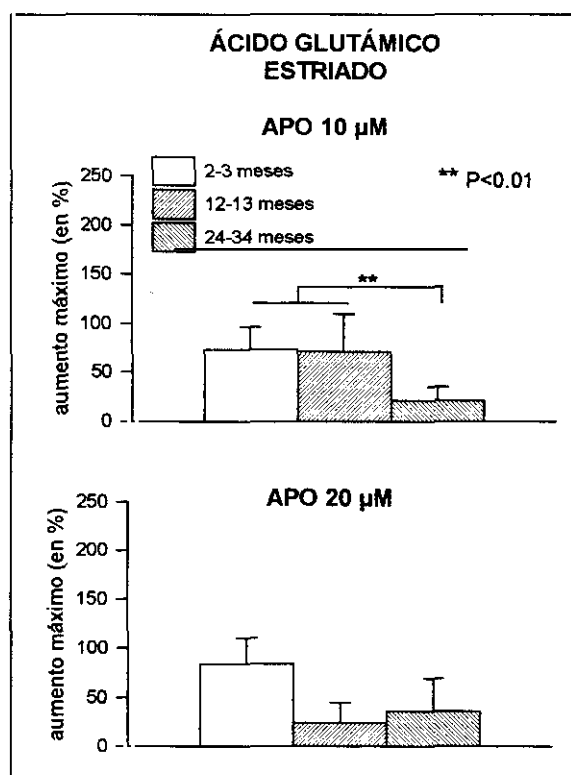


Fig. 16. Aumento máximo de las concentraciones extracelulares de ácido glutámico obtenido tras la aplicación de apomorfina (APO) a las dosis de 10 y 20 μM en el estradiol de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

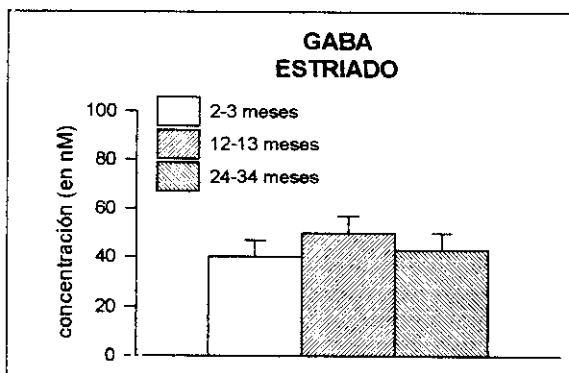


Fig. 17. Concentraciones extracelulares de GABA obtenidas en condiciones basales en el estriado de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

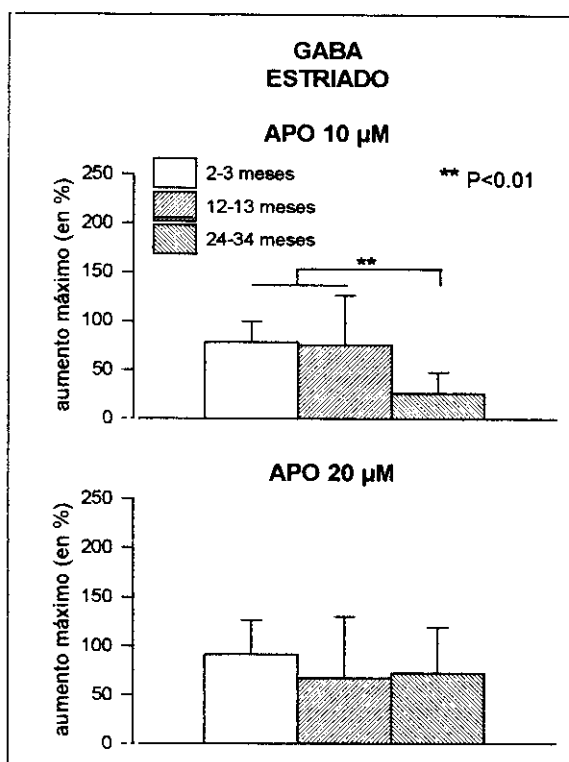


Fig. 18. Aumento máximo de las concentraciones extracelulares de GABA obtenido tras la aplicación de apomorfina (APO) a las dosis de 10 y 20 µM en el estriado de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

Resultados

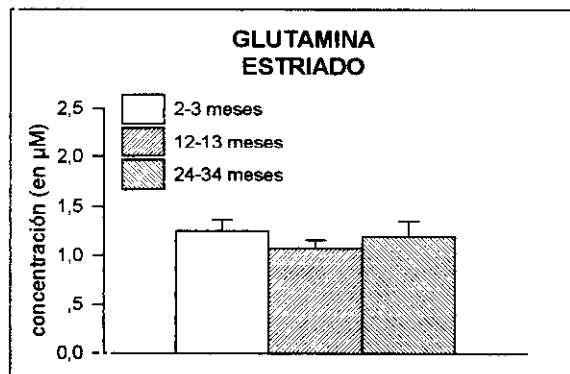


Fig. 19. Concentraciones extracelulares de glutamina obtenidas en condiciones basales en el estriado de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

2. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO: ESTUDIOS EN LA CORTEZA PREFRONTAL

2.1. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal de la rata adulta joven

La concentración extracelular de GLU obtenida en la corteza prefrontal de la rata adulta joven en condiciones basales fue, con nuestro método, de 0.29 ± 0.02 mM.

La apomorfina, a las dosis de 5 μ M y 20 μ M, no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GLU en la corteza prefrontal de ratas jóvenes. El incremento máximo alcanzó el 125% del valor control con la dosis de 5 μ M ($P > 0.10$) y el 119% del valor control con la dosis de 20 μ M ($P > 0.10$).

La aplicación de apomorfina, a la dosis de 10 μ M, produjo un aumento de la concentración extracelular de GLU. Este aumento comenzó durante la aplicación de la apomorfina y se mantuvo durante 20 min. El máximo incremento de la concentración de GLU alcanzó el 178% del valor control ($P < 0.001$).

2.2. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal de la rata de edad media

La concentración extracelular de GLU obtenida en la corteza prefrontal de la rata de edad media en condiciones basales fue, con nuestro método, de 0.36 ± 0.05 mM.

La aplicación de apomorfina a la dosis de 10 μ M no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GLU en la corteza prefrontal de las ratas de

edad media. El incremento máximo alcanzó el 115% del valor control ($P > 0.10$). Sin embargo, la apomorfina, a la dosis de 20 μ M, produjo un aumento en la concentración extracelular de GLU en la corteza prefrontal que alcanzó el 130% del valor control ($P < 0.01$).

2.3. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal de la rata vieja

La concentración extracelular de GLU obtenida en la corteza prefrontal de la rata vieja en condiciones basales fue, con nuestro método, de 0.31 ± 0.02 mM.

En las ratas viejas, la aplicación de apomorfina, a las dosis de 10 μ M y 20 μ M, no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GLU en la corteza prefrontal. El incremento máximo alcanzó el 132% del valor control con la dosis de 10 μ M ($P > 0.10$) y el 118% del valor control con la dosis de 20 μ M ($P > 0.10$).

2.4. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal de la rata a lo largo del envejecimiento

La concentración extracelular de GLU en la corteza prefrontal de la rata obtenida en condiciones basales con nuestro método no fue significativamente diferente entre los tres grupos de edad ($P < 0.10$).

El efecto de la apomorfina, a la dosis de 10 μ M, sobre las concentraciones extracelulares de GLU fue significativamente menor en los grupos de ratas de edad media y viejas que en el grupo de ratas jóvenes ($p < 0.05$). Sin embargo, el efecto de la apomorfina, a la dosis de 20 μ M, sobre las concentraciones extracelulares de GLU no fue significativamente diferente entre los tres grupos de edad.

Resultados

Grupo de edad	GLUTAMATO (corteza prefrontal)
2-3 meses (n=17)	0.29 ± 0.02
11-14 meses (n=10)	0.36 ± 0.05
24-26 meses (n=13)	0.31 ± 0.02

Tabla 9. Concentraciones extracelulares de ácido glutámico (en μM , media \pm error estándar de la media) obtenidas en condiciones basales de la corteza prefrontal de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas.

2.5. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal de la rata adulta joven

La concentración extracelular de GABA obtenida en la corteza prefrontal de la rata adulta joven en condiciones basales fue, con nuestro método, de 32 ± 4 nM.

La aplicación directa del agonista dopaminérgico apomorfina en la corteza prefrontal de ratas jóvenes produjo un aumento de la concentración extracelular de GABA dependiendo de la dosis utilizada.

A la dosis de $5 \mu\text{M}$, la apomorfina no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GABA en la corteza prefrontal de ratas jóvenes. El incremento máximo alcanzó el 120% del valor control ($P > 0.10$). A las dosis de $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$, sin embargo, la apomorfina produjo un aumento de la concentración extracelular de GABA. Con ambas dosis, el aumento en la concentración de GABA se observó durante la aplicación de la apomorfina y alcanzó el 175% ($P < 0.05$) y el 177% ($P < 0.05$) del valor control, respectivamente.

2.6. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal de la rata de edad media

La concentración extracelular de GABA obtenida en la corteza prefrontal de la rata de edad media en condiciones basales fue, con nuestro método, de 54 ± 11 nM.

En las ratas de edad media, la aplicación de apomorfina, a las dosis de 10 y $20 \mu\text{M}$, no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GABA en la corteza prefrontal. El incremento máximo alcanzó el 124% del valor control con la dosis de $10 \mu\text{M}$ ($P > 0.10$) y el 142% del valor control con la dosis de $20 \mu\text{M}$ ($P > 0.05$).

2.7. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal de la rata vieja

La concentración extracelular de GABA obtenida en la corteza prefrontal de la rata vieja en condiciones basales fue, con nuestro método, de 48 ± 6 nM.

En las ratas viejas, la aplicación de apomorfina, a las dosis de 10 y $20 \mu\text{M}$, no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GABA en la corteza prefrontal. El incremento máximo alcanzó el 140% del valor control con la dosis de $10 \mu\text{M}$ ($P > 0.10$) y el 105% del valor control con la dosis de $20 \mu\text{M}$ ($P > 0.10$).

2.8. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal de la rata a lo largo del envejecimiento

La concentración extracelular de GABA en la corteza prefrontal de la rata obtenida con nuestro método en condiciones basales no fue significativamente diferente entre los tres

grupos de edad. Sin embargo, la significación alcanzada ($P=0.06$) sugiere la necesidad de aumentar el tamaño de muestra de los grupos para confirmar este resultado. Además, la comparación posterior entre grupos indica la existencia de una mayor concentración extracelular de GABA en los grupos de ratas de edad media y viejas que en el grupo de ratas jóvenes ($P<0.05$).

El efecto de la apomorfina sobre las concentraciones extracelulares de GABA, tanto a la dosis de $10 \mu\text{M}$ ($P>0.10$) como a la dosis de $20 \mu\text{M}$ ($P>0.10$), no fue significativamente diferente entre los tres grupos de edad.

Grupo de edad	GABA (corteza prefrontal)
2-3 meses (n=17)	32 ± 4
11-14 meses (n=10)	54 ± 11
24-26 meses (n=12)	48 ± 6

Tabla 10. Concentraciones extracelulares de GABA (en nM, media \pm error estándar de la media) obtenidas en condiciones basales de la corteza prefrontal de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas.

2.9. Efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLN en la corteza prefrontal de la rata a lo largo del envejecimiento

Las concentraciones extracelulares de GLN obtenidas en la corteza prefrontal de la rata en condiciones basales fueron, con nuestro método, las siguientes: en el grupo de ratas adultas jóvenes, $1.92 \pm 0.25 \mu\text{M}$; en el grupo de ratas de mediana edad, $1.51 \pm 0.26 \mu\text{M}$ y en el grupo de ratas viejas, $1.48 \pm 0.32 \mu\text{M}$. La concentración extracelular de GLN en la corteza prefrontal de la rata en condiciones basales no se diferenció de forma significativa entre los tres grupos de edad ($P>0.10$).

La aplicación de apomorfina, a las dosis de 5, 10 y $20 \mu\text{M}$, no modificó de forma estadísticamente significativa la concentración extracelular de GLN en la corteza prefrontal de la rata en ninguno de los grupos de edad estudiados.

Grupo de edad	GLUTAMINA (corteza prefrontal)
2-3 meses (n=17)	1.92 ± 0.25
11-14 meses (n=10)	1.51 ± 0.26
24-36 meses (n=13)	1.48 ± 0.32

Tabla 11. Concentraciones extracelulares de glutamina (en μM , media \pm error estándar de la media) obtenidas en condiciones basales de la corteza prefrontal de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas.

Resultados

ÁCIDO GLUTÁMICO (corteza prefrontal)							
min	ratas adultas jóvenes			ratas de edad media		ratas viejas	
	APO 5 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=6)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=6)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=5)
10	0.30 \pm 0.04	0.27 \pm 0.06	0.31 \pm 0.03	0.30 \pm 0.07	0.43 \pm 0.07	0.31 \pm 0.05	0.33 \pm 0.04
20	0.24 \pm 0.03	0.25 \pm 0.04	0.28 \pm 0.05	0.28 \pm 0.05	0.43 \pm 0.10	0.27 \pm 0.04	0.30 \pm 0.04
30	0.28 \pm 0.05	0.29 \pm 0.05	0.34 \pm 0.06	0.26 \pm 0.04	0.46 \pm 0.09	0.30 \pm 0.04	0.37 \pm 0.05
40	0.27 \pm 0.05	0.28 \pm 0.07	0.35 \pm 0.06	0.26 \pm 0.04	0.41 \pm 0.08	0.24 \pm 0.03	0.37 \pm 0.07
50	0.26 \pm 0.03	0.28 \pm 0.04	0.26 \pm 0.04	0.27 \pm 0.06	0.45 \pm 0.07	0.27 \pm 0.04	0.29 \pm 0.04
60	0.32 \pm 0.06	0.46 \pm 0.09 ****	0.32 \pm 0.07	0.29 \pm 0.03	0.56 \pm 0.09 **	0.30 \pm 0.02	0.37 \pm 0.07
70	0.33 \pm 0.09	0.45 \pm 0.09 ****	0.38 \pm 0.11	0.28 \pm 0.06	0.49 \pm 0.12	0.25 \pm 0.03	0.32 \pm 0.09
80	0.31 \pm 0.06	0.34 \pm 0.08	0.31 \pm 0.08	0.24 \pm 0.04	0.51 \pm 0.11	0.25 \pm 0.04	0.35 \pm 0.10
90	0.28 \pm 0.06	0.31 \pm 0.06	0.30 \pm 0.06	0.27 \pm 0.04	0.39 \pm 0.08	0.27 \pm 0.05	0.25 \pm 0.04
100	0.30 \pm 0.05	0.31 \pm 0.06	0.35 \pm 0.12	0.24 \pm 0.03	0.51 \pm 0.19	0.22 \pm 0.03	0.30 \pm 0.08

Tabla 12. Concentraciones extracelulares de ácido glutámico (en μ M, media \pm error estándar de la media) obtenidas mediante perfusión intracerebral en la corteza prefrontal de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas. Durante la obtención de la sexta muestra (min 60) se administra intracerebralmente el agonista dopaminérgico apomorfina (APO) a dosis de 5, 10 ó 20 μ M. Los asteriscos indican la significación estadística de cada valor con respecto a su valor control (** = $P < 0.01$; **** = $P < 0.001$).

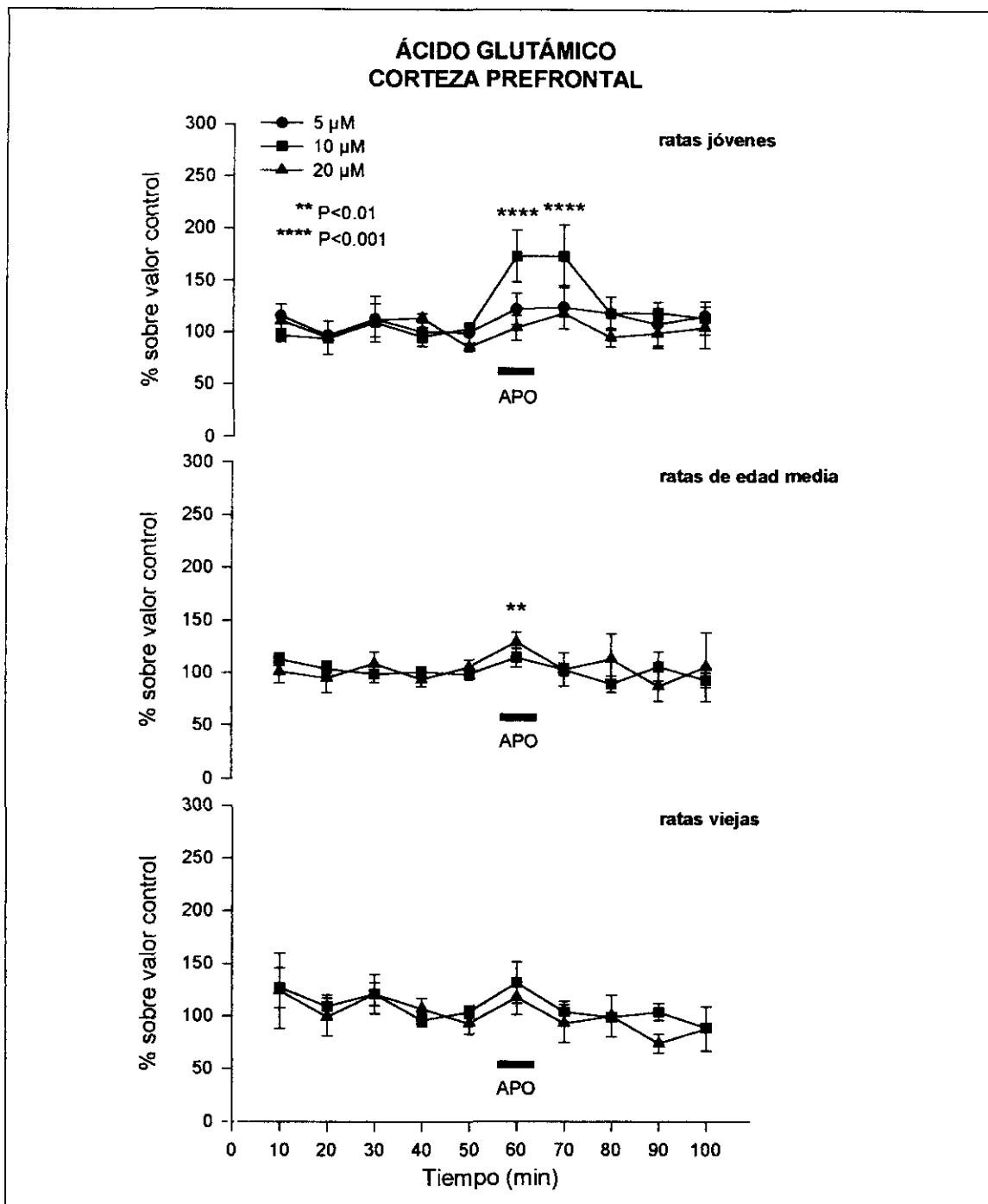


Fig. 20. Efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina (APO), a las dosis de 5, 10 y 20 μ M, sobre la concentración extracelular de ácido glutámico en la corteza prefrontal de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

Resultados

GABA (corteza prefrontal)							
min	ratas adultas jóvenes			ratas de edad media		ratas viejas	
	APO 5 μ M (n=6)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=6)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=6)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=5)
10	26 \pm 4	37 \pm 11	29 \pm 5	41 \pm 12	69 \pm 19	36 \pm 11	46 \pm 11
20	23 \pm 4	26 \pm 7	32 \pm 6	37 \pm 10	63 \pm 13	41 \pm 10	49 \pm 5
30	24 \pm 4	40 \pm 12	34 \pm 7	33 \pm 9	77 \pm 22	40 \pm 7	57 \pm 9
40	32 \pm 11	39 \pm 14	39 \pm 8	31 \pm 4	76 \pm 22	46 \pm 10	64 \pm 14
50	37 \pm 9	35 \pm 9	26 \pm 3	34 \pm 9	69 \pm 14	52 \pm 13	55 \pm 8
60	42 \pm 19	54 \pm 12 *	53 \pm 19 *	37 \pm 8	98 \pm 21	50 \pm 13	63 \pm 18
70	34 \pm 8	45 \pm 9	35 \pm 9	36 \pm 15	83 \pm 16	32 \pm 7	58 \pm 24
80	34 \pm 10	38 \pm 8	30 \pm 7	34 \pm 11	89 \pm 23	35 \pm 10	64 \pm 31
90	41 \pm 17	39 \pm 11	28 \pm 6	36 \pm 10	73 \pm 12	34 \pm 8	48 \pm 17
100	23 \pm 4	27 \pm 6	30 \pm 8	29 \pm 6	71 \pm 15	28 \pm 8	42 \pm 14

Tabla 13. Concentraciones extracelulares de GABA (en nM, media \pm error estándar de la media) obtenidas mediante perfusión intracerebral en la corteza prefrontal de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas. Durante la obtención de la sexta muestra (min 60) se administra intracerebralmente el agonista dopaminérgico apomorfina (APO) a dosis de 5, 10 ó 20 μ M. Los asteriscos indican la significación estadística de cada valor con respecto a su valor control (* = $P < 0.05$).

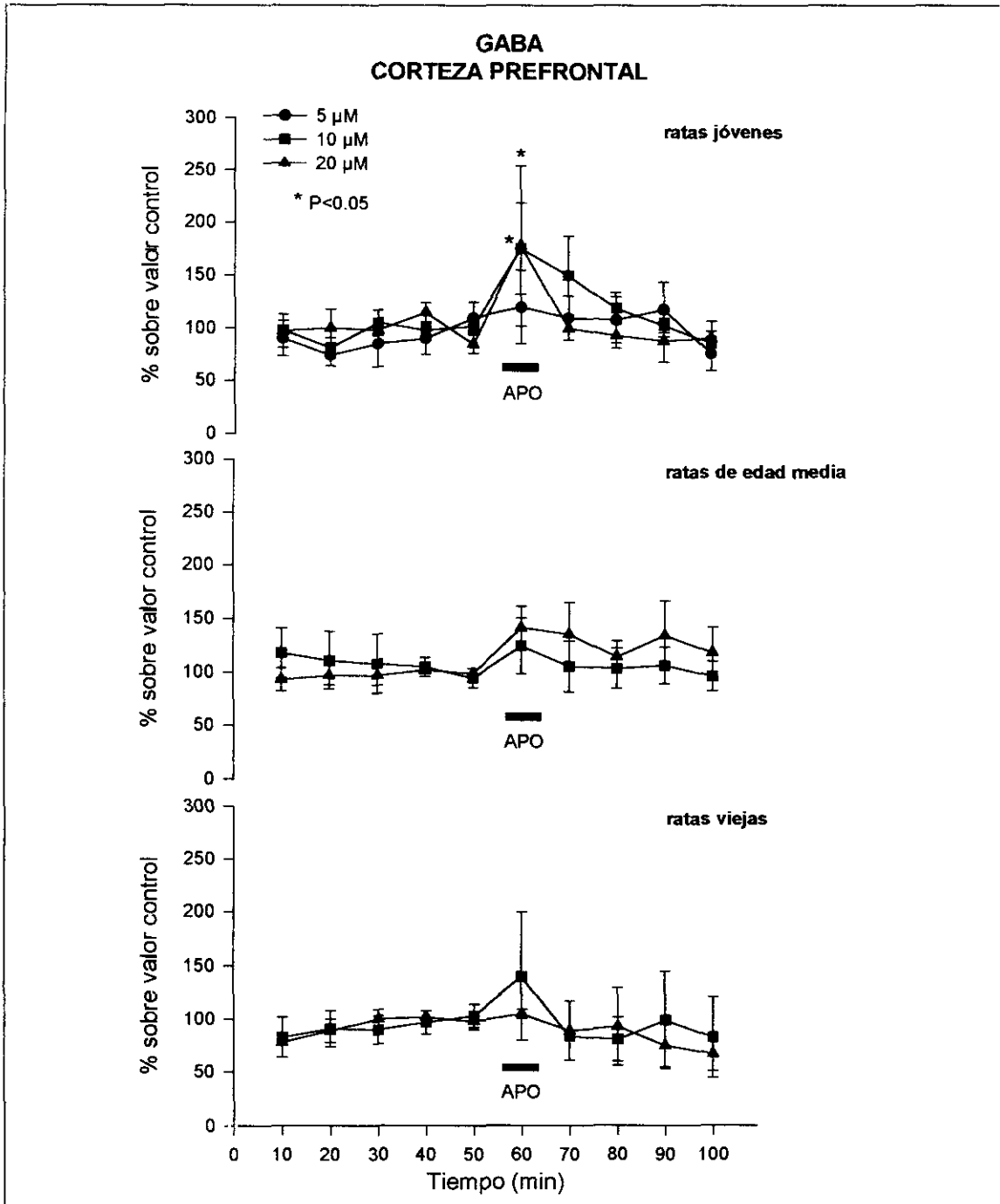


Fig. 21. Efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina (APO), a las dosis de 5, 10 y 20 μ M, sobre la concentración extracelular de GABA en la corteza prefrontal de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

Resultados

GLUTAMINA (corteza prefrontal)							
ratas adultas jóvenes			ratas de edad media		ratas viejas		
min	APO 5 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=6)	APO 20 μ M (n=4)	APO 10 μ M (n=3)	APO 20 μ M (n=5)	APO 10 μ M (n=5)	APO 20 μ M (n=3)
10	1.66 \pm 0.41	2.52 \pm 0.77	2.09 \pm 0.55	1.82 \pm 0.55	1.36 \pm 0.29	1.46 \pm 0.53	1.46 \pm 0.72
20	1.36 \pm 0.21	1.73 \pm 0.41	2.27 \pm 0.37	1.54 \pm 0.43	1.13 \pm 0.20	1.64 \pm 0.47	0.96 \pm 0.35
30	1.30 \pm 0.15	2.36 \pm 0.72	2.31 \pm 0.51	1.65 \pm 0.43	1.47 \pm 0.41	1.78 \pm 0.53	1.13 \pm 0.43
40	1.57 \pm 0.44	1.75 \pm 0.37	2.11 \pm 0.20	1.84 \pm 0.35	1.43 \pm 0.40	1.64 \pm 0.45	0.95 \pm 0.06
50	1.27 \pm 0.15	2.52 \pm 0.68	2.03 \pm 0.36	1.57 \pm 0.17	1.64 \pm 0.51	1.70 \pm 0.36	1.52 \pm 0.48
60	1.43 \pm 0.30	2.06 \pm 0.49	1.63 \pm 0.23	1.48 \pm 0.37	1.33 \pm 0.21	1.29 \pm 0.38	1.61 \pm 0.42
70	1.27 \pm 0.37	2.14 \pm 0.65	1.99 \pm 0.13	1.56 \pm 0.38	1.18 \pm 0.15	1.74 \pm 0.38	1.76 \pm 0.37
80	1.59 \pm 0.33	2.16 \pm 0.68	2.11 \pm 0.24	1.71 \pm 0.50	1.19 \pm 0.20	1.52 \pm 0.45	2.01 \pm 0.29
90	1.85 \pm 0.41	1.92 \pm 0.63	1.87 \pm 0.35	1.67 \pm 0.30	1.34 \pm 0.31	1.42 \pm 0.32	1.34 \pm 0.22
100	1.84 \pm 0.27	2.14 \pm 0.62	1.85 \pm 0.50	2.00 \pm 0.50	1.33 \pm 0.31	1.35 \pm 0.29	1.25 \pm 0.30

Tabla 14. Concentraciones extracelulares de glutamina (en μ M, media \pm error estándar de la media) obtenidas mediante perfusión intracerebral en la corteza prefrontal de ratas adultas macho jóvenes, de mediana edad y viejas. Durante la obtención de la sexta muestra (min. 60) se administra intracerebralmente el agonista dopaminérgico apomorfin (APO) a dosis de 5, 10 ó 20 μ M.

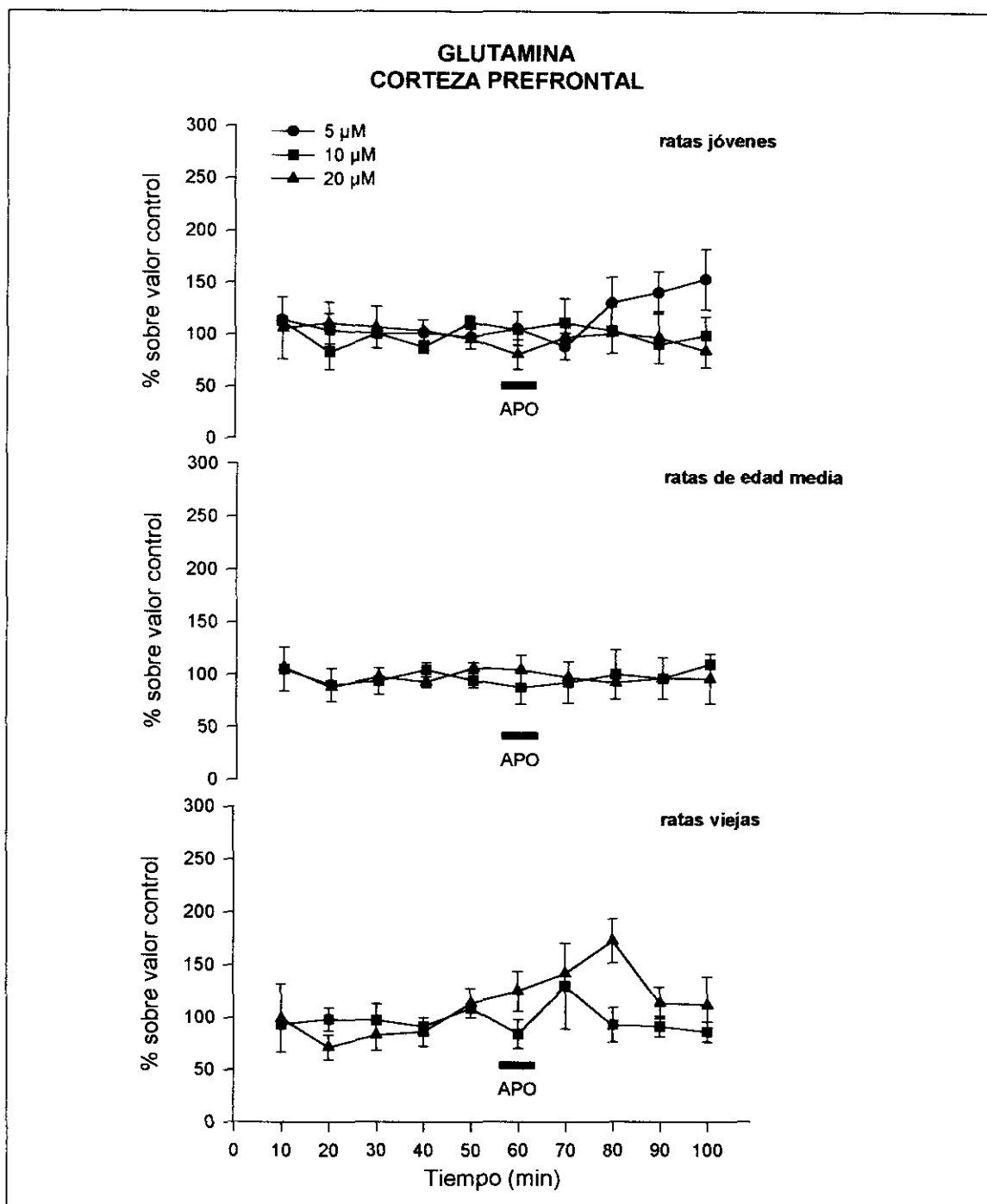


Fig. 22. Efecto de la aplicación intracerebral de apomorfina (APO), a las dosis de 5, 10 y 20 μ M, sobre la concentración extracelular de glutamina en la corteza prefrontal de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

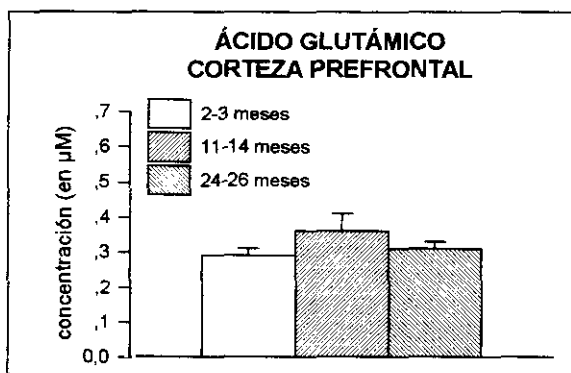


Fig. 23. Concentraciones extracelulares de ácido glutámico obtenidas en condiciones basales en la corteza prefrontal de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

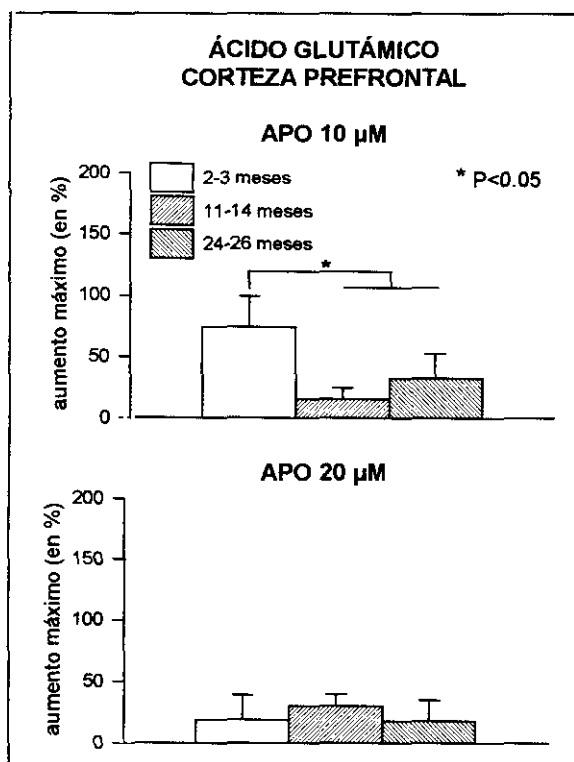


Fig. 24. Aumento máximo de las concentraciones extracelulares de ácido glutámico obtenido tras la aplicación de apomorfina (APO) a las dosis de 10 y 20 μM en la corteza prefrontal de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

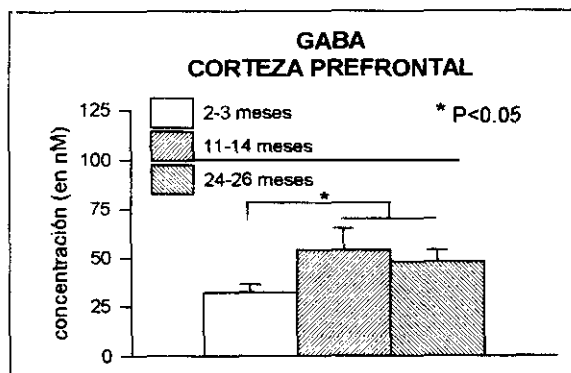


Fig. 25. Concentraciones extracelulares de GABA obtenidas en condiciones basales en la corteza prefrontal de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

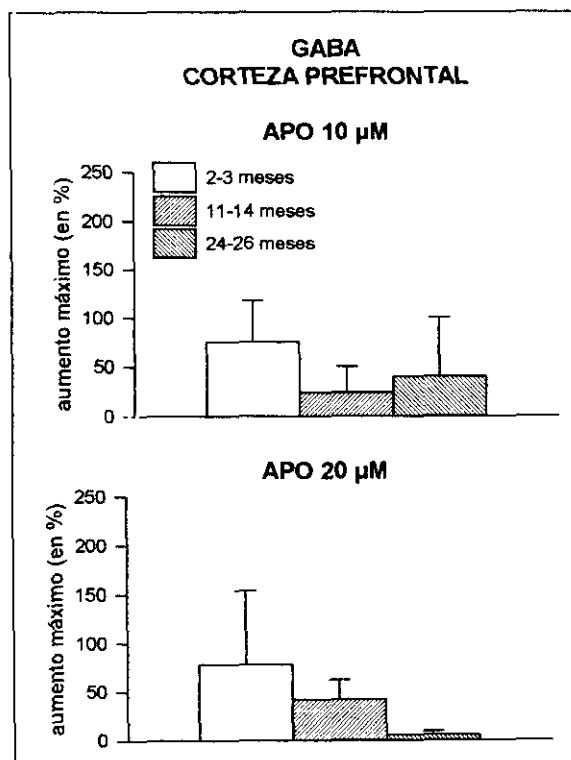


Fig. 26. Aumento máximo de las concentraciones extracelulares de GABA obtenido tras la aplicación de apomorfina (APO) a las dosis de 10 y 20 μM en la corteza prefrontal de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

Resultados

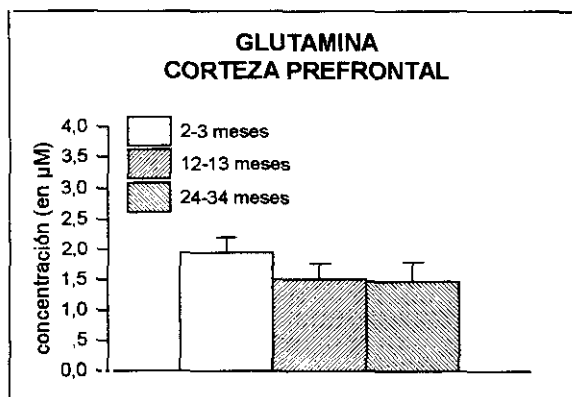


Fig. 27. Concentraciones extracelulares de glutamina obtenidas en condiciones basales en la corteza prefrontal estriado de ratas jóvenes, de edad media y viejas.

DISCUSIÓN

1. ACERCA DE LOS MÉTODOS

1.1. SOBRE EL MÉTODO DE PERFUSIÓN INTRACEREBRAL *IN VIVO*

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

La voltametría permite cuantificar las concentraciones extracelulares de neurotransmisores por medio de un microelectrodo, implantado en la región cerebral a estudiar, que oxida las moléculas de interés. Esta oxidación genera unas corrientes que pueden ser relacionadas con las concentración de la molécula oxidada (ver las revisiones de Benveniste, 1989; Westerink y Justice, 1991;

Gardner *et al.*, 1993). La gran ventaja de esta técnica es que realiza la medición de las concentraciones de neurotransmisores *in situ*. Posee, además, un tiempo de resolución muy corto (Westerink y Justice, 1991). Sin embargo, la voltametría está, en principio, limitada a la detección de neurotransmisores oxidables. Además, existen problemas de selectividad, ya que compuestos diferentes pueden poseer potenciales de oxidación similares (Benveniste, 1989; Benveniste *et al.*, 1989). En los últimos años se ha avanzado en la resolución de estas limitaciones (ver p. ej. González-Mora *et al.*, 1991). En todo caso, a diferencia de la voltametría, las técnicas *ex situ* permiten detectar todas las sustancias químicas presentes en el espacio intersticial (Myers, 1986; Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Gardner *et al.*, 1993).

El *cup* cortical consiste en un pequeño cilindro colocado quirúrgicamente en contacto directo con la superficie cortical. El *cup*, formado por el cilindro y la superficie cortical, puede ser perfundido con soluciones fisiológicas, permitiendo la recogida de sustancias difundidas desde la superficie cortical al líquido de perfusión (Benveniste,

Discusión

1989; Westerink y Justice, 1991; Gardner *et al.*, 1993). Esta técnica es la menos empleada de las técnicas *ex situ* dado que sólo permite la perfusión de estructuras cerebrales superficiales y es difícil de aplicar a animales despiertos (Westerink y Justice, 1991; Gardner *et al.*, 1993).

Frente al *cup* cortical, las técnicas de perfusión *push-pull* y de diálisis, por el contrario, permiten acceder a todas las estructuras cerebrales y pueden aplicarse al animal despierto (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner *et al.*, 1993).

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

1.1.1. Comparación de las técnicas de perfusión intracerebral: diálisis vs. *push-pull*

La presencia de una membrana dialítica en el extremo de la cánula de diálisis evita el contacto directo del líquido de perfusión con el tejido cerebral e impide el paso de sustancias de elevado peso molecular (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner *et al.*, 1993). Esta membrana evita, de este modo, el paso de proteínas al líquido recogido y, por tanto, la degradación de los neurotransmisores por acción de enzimas presentes en el líquido recogido, no siendo

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

El sistema de perfusión *push-pull* evita algunos de los inconvenientes de la diálisis, debido a que existe un contacto directo del líquido de perfusión con el espacio intersticial (Myers, 1986). De esta forma, no existe ningún obstáculo a la recuperación de sustancias del líquido extracelular. Sin embargo, por esta misma razón, es necesaria la desproteínización de las muestras antes de su análisis mediante filtración. Además, la perfusión *push-pull* provoca un mayor daño tisular debido al mayor tamaño de las cánulas de *push-pull* (0.6-0.7 mm de diámetro frente a <0.5 mm en la diálisis) y a un flujo de perfusión más elevado (20 $\mu\text{L}/\text{min}$ en el caso del *push-pull* frente a los 1 a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ de la diálisis) (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner *et al.*, 1993).

1.1.2. Limitaciones de la técnica de perfusión intracerebral *push-pull*

La técnica utilizada en los experimentos que se presentan en esta Tesis Doctoral fue la perfusión *push-pull*.

La principal desventaja de esta técnica es que produce un mayor daño tisular que la diálisis (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Westerink y Justice, 1991; Gardner *et al.*, 1993). Con el fin de hacer mínimo este daño, se tomaron las siguientes precauciones:

- se emplearon sistemas de cánulas concéntricas que se obturan con menor frecuencia (Myers, 1986);
- la distancia existente entre los extremos distales de las cánulas *push* y *pull* fue de 0.3 mm.; con esta medida el daño tisular es mínimo y la eficacia en la recogida de sustancias desde el tejido cerebral está cercana al máximo para el flujo de perfusión empleado (Yaksh y Yamamura, 1974);
- el líquido de perfusión empleado fue isotónico con respecto al líquido cefalorraquídeo, ya que las soluciones isotónicas producen un menor daño tisular que las soluciones hipotónicas o hipertónicas (Yaksh y Yamamura, 1974).

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

nueva introducción. Tales manipulaciones pueden producir un mayor daño tisular y la posibilidad de que los niveles de aminoácidos sean más reflejo del daño producido que de las concentraciones extracelulares reales.

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

La técnica *push-pull* (y también la diálisis) tiene otro inconveniente: la introducción de un cuerpo extraño en el cerebro desencadena una serie de reacciones en el tejido que perturban su homeostasia. Se ha descrito que durante los dos o tres días siguientes a la implantación de las cánulas guía no existen alteraciones apreciables en el tejido cerebral; sin embargo, a partir del tercer día se observa una reacción astrocitaria que puede alterar el metabolismo y la difusión de los aminoácidos (Myers, 1986; Benveniste y Diemer, 1987; Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991). Por este motivo, los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral se realizaron entre dos y cuatro días después de la intervención quirúrgica. Por otra parte, el extremo de la cánula *push-pull* estaba situado 3

Discusión

mm por debajo del extremo de la cánula guía en el caso de los experimentos en el estriado y 1.5 mm en el caso de los experimentos en la corteza prefrontal, por lo que el área de perfusión estaba alejada del área de posible perturbación provocada por la implantación de las cánulas guía. Además, se llevó a cabo un único experimento en cada área de perfusión, evitando así la introducción repetida de la cánula *push-pull* y el posible daño que ello produzca, a pesar de que recientemente se ha descrito que se pueden llevar a cabo experimentos de microdiálisis sucesivos durante siete días con un diseño de cánulas intercambiable (Fumero *et al.*, 1994).

La introducción de la cánula *push-pull* al comenzar los experimentos de perfusión también provoca alteraciones del tejido cerebral cercano. Por ejemplo, algunos estudios han descrito que la introducción de las cánulas produce una reacción aguda con disminución del flujo sanguíneo cerebral y del consumo de oxígeno (Benveniste *et al.*, 1987). Esta perturbación inicial hace aconsejable comenzar a recoger muestras para su análisis después de obtener niveles estables del neurotransmisor estudiado (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991). No está claro, sin embargo, cuánto tiempo debe transcurrir entre la introducción de la cánula y el inicio de los experimentos. Utilizando nuestra técnica, se comprobó previamente que los niveles de aminoácidos analizados alcanzaron un estado de equilibrio tras 50 min de perfusión continua (Porras, 1992), por lo que las muestras recogidas durante los 50 primeros min de perfusión no se analizaron en los experimentos.

A pesar de todas estas medidas, la perfusión *push-pull* (y también la diálisis) produce un cierto daño tisular. Por ello se ha cuestionado el origen (intracelular o extracelular) de las sustancias presentes en el líquido recogido. Diversos autores han

intentado contestar a esta cuestión a través de diferentes aproximaciones metodológicas:

- se han cuantificado sustancias que están presentes de forma predominante en el espacio intracelular, como LDH, y cuya salida al espacio extracelular no está en relación con la actividad neuronal; tras la aplicación de estímulos que inducen la liberación de neurotransmisores, las concentraciones extracelulares de estas sustancias no se modificaron (Greenfield *et al.*, 1983);
- se han infundido precursores de neurotransmisores marcados radiactivamente, obteniéndose, posteriormente, la liberación de neurotransmisores marcados, tanto en condiciones basales como tras estimulación (Mora y Myers, 1984; Besson *et al.*, 1986).
- se han infundido sustancias capaces de liberar neurotransmisores, como altas concentraciones de K^+ (30 a 100 mM); la obtención de un aumento en la liberación de neurotransmisores tanto en la técnica de perfusión *push-pull* como en la diálisis sugiere la integridad funcional de las neuronas en el punto de perfusión (ver p. ej. Girault *et al.*, 1986a; Yamamoto y Davy, 1992; Campbell *et al.*, 1993).

Los resultados descritos demuestran que las técnicas de perfusión intracerebral son útiles para estudiar la liberación de neurotransmisores *in vivo* (se puede consultar una revisión amplia en Ungerstedt, 1991). En relación con los aminoácidos, sin embargo, no se ha podido demostrar de forma consistente el origen celular de los aminoácidos que se recogen en las muestras. Por ejemplo, no se ha demostrado adecuadamente que las concentraciones de aminoácidos obtenidas en condiciones basales dependan de Ca^{2+} con la técnica *push-pull*. Se ha descrito que la estimulación con altas concentraciones de K^+ induce una liberación de

aminoácidos neurotransmisores que depende de la presencia de Ca^{2+} (Girault *et al.*, 1986a), lo cual sugeriría que esta liberación es excitotónica. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados. Además, la aplicación de concentraciones de K^+ por encima de 50 mM produce la salida de aminoácidos desde células gliales (Bernath, 1992) y los métodos para estudiar la dependencia del Ca^{2+} también han sido criticados (Bernath, 1992). Por otro lado, estudios realizados en nuestro laboratorio han mostrado que, usando la técnica de microdiálisis, no se puede detectar la liberación de GLU que produce la aplicación 4-aminopiridina, un bloqueante de los canales de K^+ , *in vitro*, ni aún bloqueando los sistemas de recaptación del GLU (Segovia *et al.*, 1996a).

Todos estos hechos no permiten determinar si los resultados obtenidos utilizando la técnica *push-pull* (o la diálisis) para el análisis de las concentraciones de aminoácidos neurotransmisores son realmente un buen reflejo de la liberación excitotónica de éstos. Por tanto, todos los resultados de esta Tesis Doctoral deben ser interpretados desde esta perspectiva.

1.2. SOBRE EL MÉTODO DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

El procedimiento más empleado para el análisis de aminoácidos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) debido a su gran sensibilidad (en el rango de femtomoles), a su elevada capacidad de resolución y a su gran versatilidad. El método HPLC permite utilizar pequeños volúmenes de muestra, métodos de derivación simples y un reducido tiempo de análisis y posee, además, un coste menor que otros métodos cromatográficos (Lindroth y Mopper, 1979; Jones *et al.*, 1981; Venema *et al.*, 1983; Allison y Shoup, 1984; Peinado *et al.*, 1986; Ogden y Foldi, 1986; Sherwood, 1990). Dadas las ventajas de la cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de aminoácidos, éste fue el método utilizado en

los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral.

1.2.1. De la derivación y cuantificación de aminoácidos

Para la cuantificación de los aminoácidos mediante HPLC es necesario hacer previamente una derivación de éstos. La derivación de los aminoácidos puede realizarse mediante diferentes métodos: formación de PITC-derivados (con fenilisotiocianato) (Bidlingmeyer *et al.*, 1984), formación de FMOC-derivados (con 9-fluoroenilmetil cloroformato) (Einarsson *et al.*, 1983) o formación de OPA-derivados (con o-ftaldehído) (Lindroth y Mopper, 1979).

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

La ventaja de los FMOC-derivados es su gran estabilidad (superior a las 30 h) (Ogden y Foldi, 1986). Sin embargo, el espectro de fluorescencia del reactivo está muy cercano al de los derivados y pueden existir interferencias entre ambos en el cromatograma (Ogden y Foldi, 1986).

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

Discusión

La reacción del OPA con los aminoácidos se realiza a un pH alcalino (9.5) y necesita un tiol como molécula auxiliar para dar lugar a un compuesto fluorescente e inestable (Lindroth y Mopper, 1979; Allison y Shoup, 1984). La cantidad de fluorescencia y la estabilidad de los OPA-derivados depende del tiol empleado (Venema *et al.*, 1983; Allison y Shoup, 1984). Los compuestos derivados con mercaptoetanol o mercaptopropiónico poseen mayor fluorescencia que los derivados con tertbutiltiol, pero menor estabilidad (Allison y Shoup, 1984; Herranz *et al.*, 1985; Ogden y Foldi, 1986). En el presente trabajo, el compuesto utilizado para la formación de los OPA-derivados fue el mercaptopropiónico, dado que permite una mayor sensibilidad. Con el fin de que la inestabilidad de los derivados así formados no influyese sobre la cuantificación de los aminoácidos, el tiempo transcurrido entre la adición del reactivo de derivación y la inyección de la muestra en el cromatógrafo fue constante en todos los experimentos.

1.2.2. De las condiciones cromatográficas

Para conseguir una adecuada resolución de los picos cromatográficos, se utilizó una columna de fase inversa C₁₈ de 15 cm de longitud y 5 mm de tamaño de partícula (Herranz *et al.*, 1984, 1985). Se eligió una columna de longitud intermedia dado que las columnas de mayor longitud permiten mejorar la separación de los picos cromatográficos pero lentifican el análisis, y las columnas de menor longitud requieren un menor tiempo de análisis

pero poseen una menor capacidad de separación. Con el fin de aumentar la vida media de la columna se utilizó una precolumna C₁₈ (Venema *et al.*, 1983).

El pH de la fase móvil utilizada en este trabajo de investigación fue de 5.67, el cual permite una adecuada separación de los aminoácidos OPA-derivados y se encuentra dentro de los márgenes tolerados por la columna (2 < pH < 8). Dado que la derivación de las muestras requiere un pH de 9.5 (Allison y Shoup, 1984), previamente a su inyección se le añadieron a las muestras 5 mM de ácido acético al 5% con el fin de evitar la pérdida de sílice de la columna (Cobo, 1990).

1.2.3. De la variabilidad del método de análisis

El método de análisis de aminoácidos por HPLC acoplado a detectores tanto de fluorescencia como electroquímicos es un método sensible y reproducible para el estudio de los niveles endógenos de aminoácidos (Venema *et al.*, 1983; Peinado *et al.*, 1986). El método cumple las condiciones de linealidad entre 1 pmol y 10 nmoles de aminoácidos por muestra y para volúmenes de muestra comprendidos entre 10 y 500 µl (Venema *et al.*, 1983; Peinado *et al.*, 1986). Las concentraciones de aminoácidos presentes en las muestra analizadas en este trabajo (0.01-1 µM), así como los volúmenes de muestra utilizados (20 µl), se encuentran dentro del rango en el que el método cumple la condición de linealidad. Además, previo a los experimentos, se confirmó tal condición.

2. ACERCA DE LOS RESULTADOS

2.1. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN EL ESTRIADO DE LA RATA

La aplicación intracerebral de un agonista de los receptores dopaminérgicos D1 y D2, la apomorfina, produjo, en el estriado de la rata adulta joven, un aumento de la concentración extracelular de GLU y GABA.

El aumento de las concentraciones extracelulares de GLU en el estriado de la rata tras la aplicación de un agonista dopaminérgico ha sido descrito previamente por nuestro laboratorio utilizando la misma técnica (Expósito *et al.*, 1994). También Godukhin *et al.* (1984), utilizando la técnica de *push-pull* (aunque con varias diferencias en su aplicación con respecto a la utilizada por nosotros) han descrito un aumento de las concentraciones de GLU tras la aplicación de apomorfina a la dosis de 100 μ M, así como tras la aplicación de DA. El aumento de las concentraciones extracelulares de GABA en el estriado de la rata tras la estimulación de receptores de DA (concretamente de receptores D1) también ha sido descrito previamente (Girault *et al.*, 1986b).

En oposición a los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral, Yamamoto y Davy (1992) y Donzanti *et al.* (1993), utilizando la técnica de microdiálisis, han descrito que la aplicación de agonistas selectivos de los receptores de DA D1 y D2 en el estriado no producen ningún cambio significativo en las concentraciones extracelulares de GLU y GABA en condiciones basales. La explicación a esta discrepancia entre nuestro resultados y los descritos por estos autores puede encontrarse en la diferente manipulación de la neurotransmisión dopaminérgica utilizada. Puesto que en el trabajo citado se utilizan agonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos, el efecto estudiado es el de la estimulación de uno solo de los tipos de receptores dopaminérgicos. En nuestro trabajo, sin embargo, se utiliza un agonista no selectivo de los receptores de DA, por lo que el efecto obtenido es el resultado de la estimulación simultánea de varios tipos de receptores dopaminérgicos. Este hecho parece indicar que los efectos de la estimulación simultánea de varios tipos de receptores de DA pueden ser cualitativamente diferentes de los efectos de la estimulación de cada uno de esos tipos de receptores por separado.

Discusión

Aunque esta posibilidad no ha sido estudiada por nosotros, otros autores han descrito hechos que la apoyan. Por ejemplo, se ha descrito que la conducta inducida por la estimulación conjunta de los receptores D1 y D2 es diferente de la inducida por la estimulación de estos receptores por separado (Koshikawa *et al.*, 1991). También se ha descrito que los efectos postsinápticos de la estimulación selectiva de los receptores D2 son diferentes de los obtenidos tras la estimulación simultánea de los receptores D1 y D2 (Wachtel *et al.*, 1989).

Por tanto, es posible que la discrepancia que existe entre los resultados descritos por el grupo de Yamamoto (Yamamoto y Davy, 1992; Donzanti *et al.*, 1993) y los de esta Tesis Doctoral pueda explicarse en función de la presencia, en nuestros experimentos, de una interacción entre los receptores D1 y los receptores D2.

2.1.1. Interacción DA-GLU en el estriado de la rata

Nuestros resultados muestran que la estimulación simultánea de los receptores D1 y D2 en el estriado de la rata produce un aumento de la concentración extracelular de GLU. Este trabajo no ha estudiado los mecanismos mediante los cuales se puede producir este efecto. Sin embargo, los conocimientos que se tienen sobre la histología y la neuroquímica del cerebro de la rata nos permiten discutir varias posibilidades.

El aumento de las concentraciones extracelulares de GLU en el estriado tras la aplicación del agonista dopaminérgico apomorfina puede ser debido a un aumento de la liberación de GLU (exocitótica o citoplasmática) o a una disminución de la recaptación de GLU.

2.1.1.1 ¿Liberación de GLU o inhibición de su recaptación?

Algunos autores, utilizando técnicas *in vitro*, han descrito cómo la apomorfina puede inhibir la recaptación de GLU (Nieoullon *et al.*, 1982). Aunque los resultados presentados en esta Tesis Doctoral podrían ser explicados a través de esta acción de la apomorfina, estudios previos de nuestro laboratorio parecen contradecir esta posibilidad. De hecho, Expósito *et al.* (1994) han descrito que la microinyección previa de un inhibidor de la glutamina-sintetasa (la metionina-sulfoximina) produce una disminución dramática de las concentraciones extracelulares de GLN y, también, la desaparición del aumento de la concentración de GLU inducida por apomorfina. Estos resultados parecen sugerir que el aumento de la concentración de GLU inducido por apomorfina necesita de la presencia de GLN (y, por tanto, de la síntesis de GLU). De ello podría deducirse que este aumento de GLU procede más de una liberación de GLU que de una disminución de su recaptación.

2.1.1.2. Liberación de GLU ¿vesicular o citoplasmática?

Como se ha expuesto en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la liberación de GLU desde la terminación nerviosa puede producirse a través de mecanismos dependientes de Ca^{2+} (exocitosis de las vesículas presinápticas) o mediante mecanismos independientes de Ca^{2+} (inversión del sentido del transporte de GLU), aun cuando este último mecanismo no ha sido bien demostrado en estudios *in vivo* (ver Nicholls, 1989 y Levi y Raiteri, 1992). En esta Tesis Doctoral no se ha estudiado la dependencia de Ca^{2+} de la liberación del GLU inducida por apomorfina. Sin embargo, Godukhin *et al.* (1984) han descrito que el

aumento de la concentración de GLU tras la aplicación de 100 μM de apomorfina no varía cuando en el medio de perfusión el Ca^{2+} es sustituido por Co^{2+} , pero sí disminuye cuando el Na^+ es sustituido por colina. Aunque la dosis utilizada por estos autores es un orden de magnitud superior a la utilizada por nosotros, estos resultados parecen sugerir que la apomorfina produce un aumento de la concentración de GLU a través de un mecanismo dependiente de Na^+ pero independiente de Ca^{2+} . Por tanto se podría concluir que la apomorfina induce una inversión del sentido del transporte de GLU a nivel de las membranas de la terminación nerviosa y/o de las células gliales circundantes.

El mecanismo mediante el cual la apomorfina produce esta inversión del transporte de GLU es desconocido. Sí se puede sugerir, sin embargo, que tal mecanismo está mediado por la activación de receptores dopaminérgicos, ya que tanto Godukhin *et al.* (1984) como nosotros (Expósito *et al.*, 1994) hemos demostrado que la liberación de GLU inducida por apomorfina es atenuada por la aplicación previa del antagonista dopaminérgico haloperidol.

No está clara la forma en la que una activación de los receptores de DA podría modificar el transportador de GLU. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que el transportador de GLU puede estar regulado por fosfatasa y proteína-quinasas (ver la revisión de Danbolt, 1994), por lo que la fosforilación de proteínas que se produce tras la activación de receptores de DA podría actuar también sobre el transportador de GLU. Por otra parte, Levi y Raiteri (1992) han sugerido que la liberación de GLU y GABA inducida por agonistas del GLU puede producirse, en parte, a través de la inversión de sus transportes debido a que la propia excitación neuronal produce entrada de

Na^+ . Es posible que este mismo mecanismo pueda jugar un papel en el aumento de las concentraciones extracelulares de GLU y GABA inducido por apomorfina.

La hipótesis de que la apomorfina produzca su efecto sobre las concentraciones de GLU a través de la activación de receptores de DA se opone a las observaciones histológicas que describen, en el estriado de la rata, la ausencia (o muy escasa presencia) de sinapsis axo-axónicas y, por tanto, de una conexión directa entre los axones glutamatérgicos procedentes de la corteza y los axones dopaminérgicos procedentes del mesencéfalo (ver Kornhuber y Kornhuber, 1983). Para explicar esta discrepancia se ha sugerido la presencia de receptores de DA en los axones que contienen GLU a pesar de que no existan sinapsis entre ellos. Estos receptores estarían, por tanto, fuera del confinamiento espacial de las sinapsis, en el marco de lo que se conoce como «*neurotransmisión volumétrica*» (para una revisión extensa de este concepto se puede consultar Fuxe y Agnati, 1991). En el estriado se ha invocado previamente la existencia de este tipo de transmisión neural para explicar ciertos fenómenos que no pueden ser entendidos con las descripciones clásicas (ver p. ej. García-Muñoz *et al.*, 1991). Además, algunos resultados experimentales han confirmado la existencia de receptores para DA fuera de las sinapsis que poseen una alta afinidad por la DA (ver Díaz *et al.*, 1995). De confirmarse la existencia de receptores para la DA en las terminaciones nerviosas procedentes de la corteza (hecho que ha sido objeto de discusión durante la última década: ver Kornhuber y Kornhuber, 1986; Trugman *et al.*, 1986; Joyce y Marshall, 1987; Maura *et al.*, 1988) podría ser fácilmente explicable el efecto de la apomorfina sobre la liberación de GLU por el mecanismo antes mencionado.

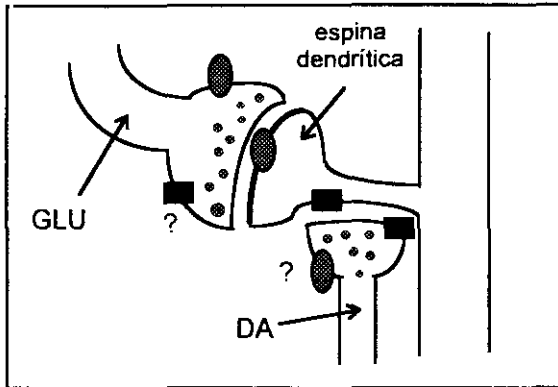


Fig. 28. Representación esquemática de la convergencia que existe entre las terminaciones glutamatergicas (GLU) procedentes de la corteza y las terminaciones dopaminérgicas (DA) procedentes del mesencéfalo sobre las neuronas espinosas gabérgicas del estriado de la rata. Los rectángulos negros representan los receptores dopaminérgicos (se discute su presencia en las terminaciones glutamatergicas). Los óvalos grises representan los receptores glutamatergicos (se discute su presencia en las terminaciones dopaminérgicas). Basado en Smith y Bolam, 1990 y Parent y Hazrati, 1995.

2.1.1.3. Liberación citoplasmática de GLU ¿de origen neuronal o de origen glial?

Como ya se ha comentado en el apartado que discute la utilidad de las técnicas de perfusión intracerebral, estas técnicas no pueden dilucidar el origen celular (neuronal o astrocitario) de los aminoácidos recogidos. Sin embargo, los datos discutidos aquí sugieren que el aumento de GLU producido por la apomorfina se produce como consecuencia de la inversión del sentido del transporte de GLU. Puesto que el transporte de GLU tiene lugar de forma predominante en las células gliales, se puede sugerir que el GLU liberado por la apomorfina es de origen glial.

Como ya se ha comentado, el efecto de la apomorfina sobre la liberación de GLU está

mediado por la estimulación de receptores de DA. Por tanto, para que la hipótesis del origen glial del GLU sea consistente es necesario que existan receptores de DA en las células gliales. Este hecho ha sido, efectivamente, descrito (Hösli y Hösli, 1986). La forma en que la estimulación de receptores de DA en los astrocitos pueda regular el transporte de GLU no está clara. Sin embargo, como ya se ha discutido, el hecho de que el transportador de GLU posea un lugar susceptible de fosforilación (ver la revisión de Danbolt, 1994) indica que puede existir una regulación de este transportador a través de los segundos mensajeros activados por los receptores de DA. Además, un mecanismo semejante ya ha sido descrito para los receptores de noradrenalina (ver Hansson, 1991).

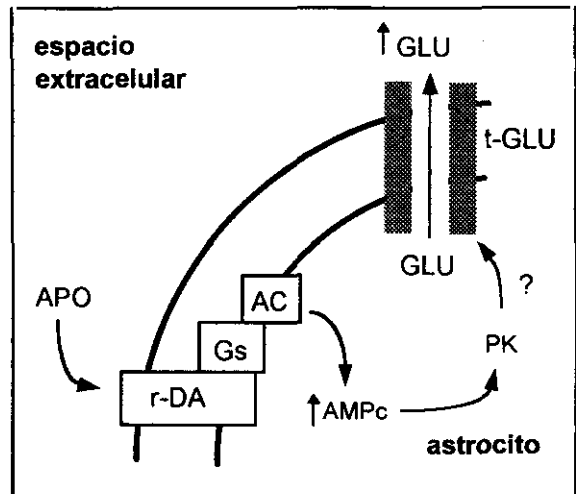


Fig. 29. Hipótesis de la regulación dopaminérgica del transporte glial de glutamato. La activación de receptores dopaminérgicos de la membrana de los astrocitos podría regular la molécula transportadora de ácido glutámico invirtiendo el sentido del transporte de éste. AC: adenilato-ciclasa APO: apomorfina; Gs: proteína G estimuladora; PK: proteína-kinasas; r-DA: receptor dopaminérgico; t-GLU: transportador de glutamato. Basado en Hansson, 1991.

En definitiva, por todos los datos discutidos hasta aquí, sugerimos que la apomorfina produce un aumento de las concentraciones de GLU en el estriado de la rata a través de la estimulación de receptores de DA situados en los astrocitos que produce la inversión del transporte de GLU.

2.1.1.4. Otras posibilidades

Las posibilidades hasta aquí discutidas hacen referencia únicamente a la hipótesis de que la apomorfina produzca una liberación de GLU a través de la inversión del sentido de su transporte. Sin embargo, puesto que esta hipótesis, aunque la más probable, no está enteramente demostrada, no podemos descartar la posibilidad de que el aumento de la concentración de GLU inducido por la apomorfina proceda de una liberación exocitótica presináptica. En todo caso, la apomorfina produciría este efecto a través de la estimulación de receptores de DA (ver más arriba). Por tanto, esta hipótesis es, también, inconsistente con la ausencia de conexiones sinápticas entre las terminaciones dopaminérgicas y glutamatérgicas del estriado. Se pueden dar dos explicaciones a esta aparente contradicción. Una refiere a la existencia de un mecanismo «volumétrico» de transmisión (esta explicación ha sido discutida más arriba). La otra refiere a la activación de una vía neural larga. Esta vía neural estaría formada por las neuronas gabérgicas, que presentan receptores para DA y que proyectan a núcleo pálido; las neuronas gabérgicas de éste, que, a su vez, establecen sinapsis con neuronas glutamatérgicas del tálamo y, finalmente, las neuronas talámicas que, ya sea directamente (existen terminaciones talámicas en el estriado), ya a través de sus conexiones con la corteza frontal y desde ésta con el estriado, pueden inducir la liberación presináptica de GLU en esta estructura.

2.1.2. Interacción DA-GABA en el estriado de la rata

Nuestros resultados muestran que la aplicación del agonista dopaminérgico apomorfina en el estriado de la rata produce un aumento de la concentración extracelular de GABA.

El aumento de la concentración de GABA tras la aplicación de apomorfina puede ser producido por un aumento de la liberación de GABA o por una disminución de la recaptación de GABA.

Este trabajo no ha estudiado los mecanismos mediante los cuales se produce este efecto. La bibliografía tampoco aporta datos acerca de la dependencia iónica del aumento de GABA inducido por agonistas dopaminérgicos *in vivo*. Por tanto, serían necesarios experimentos *in vivo* que estudiaran si este aumento de GABA es dependiente de Ca^{2+} y de Na^+ . En todo caso se pueden discutir varias posibilidades.

La presencia de receptores de DA en las neuronas gabérgicas del estriado sugiere que la apomorfina, estimulando directamente estos receptores, produce excitación de estas neuronas y liberación presináptica de GABA, ya sea vesicular (dependiente de Ca^{2+}), ya sea citoplasmática (por inversión del sentido de su transporte). Estudios *in vitro* han demostrado que la aplicación de DA a dosis superiores a 10 μ M, produce una liberación de GABA a través de su transportador (Bernath y Zigmond, 1989). Dado que las dosis de apomorfina utilizadas por nosotros son del mismo orden de magnitud que las utilizadas en el trabajo descrito, y que la apomorfina tiene una afinidad por los receptores de DA semejante a la de la propia DA, se podría sugerir que el efecto observado por nosotros en las concentraciones extracelulares de GABA se debe, también, a

Discusión

una inversión del sentido del transporte de GABA.

Por otra parte, el hecho de que la apomorfina produzca un aumento de la concentración de GLU (ver más arriba) y de que la estimulación de receptores de GLU produzca una liberación de GABA (Morari *et al.*, 1993; Young y Bradford, 1993) sugiere que la apomorfina también puede producir un aumento de la concentración de GABA mediante la liberación previa de GLU. La bibliografía no nos permite discutir este punto más allá. La realización de experimentos en los que, de forma simultánea, se estimulasen receptores de DA y se bloqueasen receptores de GLU podría ayudarnos a determinar cuál de estas dos hipótesis es cierta.

2.2. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA

La aplicación intracerebral de un agonista de los receptores dopaminérgicos D1 y D2, la apomorfina, produjo, en la corteza prefrontal de la rata adulta joven, un aumento de la concentración extracelular de GLU y GABA. Estos resultados no han sido descritos previamente en la literatura.

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

Nuestros resultados muestran, por primera vez, que la estimulación de los receptores de DA en la corteza prefrontal de la rata produce un aumento de la concentración extracelular de GLU.

El aumento de la concentración de GLU tras la estimulación de los receptores de DA puede deberse a un aumento de su liberación o a una disminución de su recaptación. En este trabajo no se han estudiado los mecanismos celulares implicados en este efecto. Puesto que ésta es la primera descripción de este fenómeno, la bibliografía tampoco aporta datos

que puedan ayudarnos a comprender estos mecanismos. Sería necesario realizar experimentos para estudiar si el aumento de las concentraciones de GLU en la corteza prefrontal se debe a una liberación vesicular o citoplasmática.

En todo caso, el aumento de la concentración de GLU tras la estimulación de los receptores de DA en la corteza prefrontal de la rata resulta coherente con los conocimientos que se tienen sobre la histología y neuroquímica de esta región cortical. Así, se sabe que las terminaciones dopaminérgicas que proceden de áreas mesencefálicas forman sinapsis con las neuronas piramidales glutamatérgicas de la corteza prefrontal (Van Eden *et al.*, 1987; Séguéla *et al.*, 1988; Verney *et al.*, 1990) y que estas neuronas presentan receptores D1 en sus dendritas (Retaux *et al.*, 1991a) y receptores D2 en las terminaciones de sus ramas axonales recurrentes (Retaux *et al.*, 1991b). Thierry *et al.* (1986) han sugerido que los receptores D1 son excitadores en la corteza prefrontal de la rata mientras que los receptores D2 son inhibidores. Además, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que el aumento de la concentración de GLU inducido por apomorfina se atenúa tras el bloqueo de los receptores de DA con haloperidol. Todos estos hechos nos hacen sugerir que la apomorfina induce un aumento de la concentración de GLU en la corteza prefrontal mediante la estimulación de receptores D1 situados en las dendritas de las neuronas piramidales.

El hecho de que la aplicación de apomorfina produzca un aumento de la concentración de GLU sólo a una de las dosis utilizadas (la intermedia) es de difícil explicación, dado lo semejantes que son las dosis que producen efectos adversos. Sin embargo, se pueden discutir varias posibilidades.

La apomorfina es un agonista de los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Como ya se ha comentado, los efectos de la estimulación simultánea de varios tipos de receptores de un neurotransmisor (en este caso la DA) pueden ser cualitativamente diferentes de los efectos de la estimulación de cada uno de esos tipos de receptores por separado (ver el apartado 2.1. de este capítulo). Aunque esta posibilidad no ha sido estudiada por nosotros, se puede especular acerca del hecho de que el efecto obtenido tras la aplicación de apomorfina sea el resultado de un balance entre los efectos de ambos tipos de receptores.

La existencia de interacciones múltiples entre diferentes neurotransmisores en la corteza prefrontal puede contribuir, también, a la existencia de un efecto de la apomorfina sobre el GLU en un rango tan estrecho de dosis. De hecho, la apomorfina produce también un incremento de la concentración extracelular de GABA (esta Tesis), cuyos efectos sobre las terminaciones glutamatérgicas son inhibidores. Además, el efecto inhibitor de la DA sobre las neuronas piramidales de la corteza prefrontal descrito clásicamente (ver p. ej. Mora *et al.*, 1976) está mediado, en parte, por neuronas gabérgicas (Pirot *et al.*, 1992). De hecho, la estimulación de receptores de DA en la corteza prefrontal produce un aumento de la tasa de disparo de potenciales de acción de las neuronas gabérgicas y un incremento de los potenciales postsinápticos inhibidores medidos en las neuronas piramidales que son expresión de la actividad de las neuronas gabérgicas (Penit-Soria *et al.*, 1987). Todo ello sugiere que los efectos de la apomorfina sobre el GLU podrían estar modulados por el GABA liberado. Por tanto, la interacción entre DA y GABA podría contribuir a explicar la existencia de un efecto de la apomorfina sobre el GLU en un rango tan estrecho de dosis.

2.2.2. Interacción DA-GABA en la corteza prefrontal de la rata

Nuestros resultados muestran, por primera vez, que la estimulación de los receptores de DA en la corteza prefrontal de la rata produce, *in vivo*, un aumento de la concentración extracelular de GABA.

El aumento de la concentración de GABA tras la estimulación de los receptores de DA puede deberse a un aumento de su liberación o a una disminución de su recaptación. En este trabajo no se han estudiado los mecanismos celulares implicados en este efecto. Puesto que esta es la primera descripción de este fenómeno, la bibliografía tampoco aporta datos que puedan ayudarnos a explicar este hecho. Sería necesario realizar experimentos para estudiar si el aumento de las concentraciones de GABA en la corteza prefrontal se debe a una liberación vesicular o citoplasmática.

En todo caso, el aumento de la concentración de GABA tras la aplicación de apomorfina en la corteza prefrontal es coherente con los resultados obtenidos por otros autores con diferentes técnicas. Así, se ha demostrado que la estimulación de receptores de DA produce liberación de GABA *in vitro* (Reteux *et al.*, 1991) y aumento de la tasa de disparo de potenciales de acción de las neuronas gabérgicas (Penit-Soria *et al.*, 1987). Ello, junto con el hecho de que el aumento de GABA inducido por apomorfina es atenuado por el bloqueo de los receptores de DA con haloperidol (resultados no mostrados en esta Tesis), sugiere que este efecto está mediado por receptores de DA. Aunque, en nuestro conocimiento, no existen descripciones que demuestren de forma consistente la presencia de receptores de DA en las neuronas gabérgicas de la corteza prefrontal de la rata, nuestros resultados y el hecho de que las terminaciones

Discusión

dopaminérgicas y gabérgicas converjan sobre las neuronas piramidales de la corteza, sugieren esta posibilidad.

2.3. INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO

2.3.1. Sobre las dificultades de interpretación de los estudios sobre envejecimiento

En la investigación sobre el proceso de envejecimiento existen varios factores que contribuyen a complicar la interpretación de los resultados que se obtienen. Entre estos factores cabe señalar, por ejemplo, las posibles diferencias en el proceso de envejecimiento entre las especies, y también entre las razas, de los animales de experimentación empleados. Pero el principal obstáculo con que se encuentran los estudios sobre envejecimiento reside en la propia dificultad de definir de forma precisa cuándo empieza la senectud. La utilización de la edad cronológica como factor definidor de envejecimiento no es una buena medida. De hecho, algunos cambios, o ausencia de ellos, descritos en animales "viejos" pueden ser debidos a utilizar animales de edad no suficientemente avanzada. Igualmente, el hecho de utilizar animales de edad muy avanzada puede llevar a conclusiones erróneas, ya que los resultados pueden estar sesgados por la selección a que han sido sometidos dichos individuos. Sin embargo, mientras no tengamos marcadores biológicos de vejez (si existen), la edad es el único parámetro de que disponemos para delimitar este periodo.

Una forma de evitar, en alguna medida, el problema de determinar cuándo comienza el proceso de envejecimiento, es estudiar los parámetros objeto de investigación en varios grupos de edad. Por ello, en esta Tesis Doctoral se han utilizado tres grupos de animales de diferente edad: las ratas de 2 a 3 meses de edad

de la raza Wistar son animales adultos y se utilizaron como grupo control. Las ratas Wistar de 11 a 14 meses de edad son animales que empiezan a perder su capacidad reproductora; por ello se utilizaron como grupo de adultos de edad avanzada pero que no se puede considerar que hayan entrado ya en la vejez. Las ratas Wistar de más de 21 meses de edad se utilizaron como grupo de animales viejos.

Otro aspecto importante que interfiere en la interpretación adecuada de los estudios sobre envejecimiento es el sesgo introducido en los resultados por variables ambientales y por patologías asociadas. En algunas ocasiones no se puede discernir acerca de si un determinado cambio se debe al propio envejecimiento, al entorno que ha rodeado al individuo o a alguna enfermedad concomitante. En el caso del trabajo experimental realizado en esta Tesis Doctoral, se deben discutir los resultados teniendo presente que los animales de experimentación están sometidos a condiciones no "normales": con poco espacio para deambular, con comida *ad libitum*, con temperatura y humedad ambiental estables, etc.; en resumen, en un ambiente que podría definirse como pobre en estímulos. Por decirlo de otra forma, cabe preguntarse si nuestros resultados sobre envejecimiento se han obtenido de animales sometidos a un envejecer "no normal" y si esto puede influir en las conclusiones que debemos extraer de ellos.

Los resultados que aquí se discuten acerca del efecto del envejecimiento sobre la interacción de neurotransmisores deben ser interpretados desde esta perspectiva.

2.3.2. Efecto del envejecimiento sobre las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral muestran que las concentraciones extracelulares de GLU, GABA y GLN

obtenidas con nuestro método en condiciones basales no varían significativamente con la edad ni en el estriado ni en la corteza prefrontal de la rata.

Como ya se ha comentado (ver el apartado de discusión de los métodos), no se ha podido demostrar de forma consistente el origen de las concentraciones de aminoácidos obtenidas con técnicas de perfusión intracerebral (*push-pull* o diálisis). Por tanto, el análisis de las concentraciones extracelulares de aminoácidos durante el envejecimiento debe ser interpretado bajo esta perspectiva. En todo caso, debe señalarse que, aunque no podemos determinar con seguridad el origen celular de los aminoácidos analizados, el análisis de su concentración extracelular es un indicador de la cantidad de GLU y GABA disponible para ser liberado (ya sea a través de exocitosis o a través del transportador neuronal o glial).

En relación con el GLU, nuestros resultados coinciden con los trabajos publicados previamente por varios laboratorios, utilizando técnicas diversas y tanto en estriado como en corteza prefrontal (ver p. ej. Dawson *et al.*, 1989; Cobo *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1994; Sánchez-Prieto *et al.*, 1994; Saransaari y Oja, 1994). Este hecho podría interpretarse como un reflejo de que las neuronas glutamatérgicas no se ven afectadas durante el proceso de envejecimiento o, si se produce muerte de estas neuronas, existen mecanismos que la compensan.

En relación con el GABA, en nuestro conocimiento, no existen trabajos que estudien la concentración extracelular de GABA durante el envejecimiento. Nuestros resultados podrían sugerir que las neuronas gabérgicas no se ven afectadas por el proceso de envejecimiento o, en caso contrario, que existen mecanismos que compensan una posible pérdida de estas neuronas. Sin embargo, las limitaciones tanto de la técnica *push-pull* (ya comentadas), como

de nuestro método de análisis de GABA (las concentraciones de GABA obtenidas se encuentran cercanas al límite de detección de nuestro método) no nos permiten discutir más allá estos resultados.

El mantenimiento de las concentraciones de GLN con el envejecimiento descritas en esta Tesis Doctoral resulta coherente con la estabilidad descrita para los aminoácidos neurotransmisores GLU y GABA de los que es precursor. En estudios previos de nuestro laboratorio se describió la existencia de una concentración extracelular de GLN mayor en la corteza prefrontal y temporal de ratas viejas en comparación con ratas jóvenes (Cobo *et al.*, 1992). Nuestros resultados actuales, utilizando un grupo más de edad y la técnica de *push-pull* continuo, no confirman aquellos resultados preliminares para la corteza prefrontal

2.3.3. Interacción de neurotransmisores y envejecimiento: estudios en el estriado de la rata

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral muestran que la aplicación de apomorfina produce un aumento de las concentraciones de GLU y GABA en el estriado de la rata joven y que tal efecto se encuentra atenuado en las ratas de edad media y viejas.

Aunque no conocemos los mecanismos por los que la apomorfina produce este aumento de GLU y GABA en el estriado, la bibliografía nos permite sugerir que está mediado por la estimulación de los receptores de DA. A la vista de esta hipótesis, la disminución del efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU y GABA puede explicarse por una disminución de la cantidad de GLU o GABA disponible para ser liberado (por las neuronas o por las células gliales) o por una disminución de la capacidad de los receptores de DA para ser estimulados.

Discusión

La bibliografía revisada y los datos presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que la cantidad de GLU y GABA disponible en el cerebro se conserva durante el envejecimiento (ver más arriba).

Por otra parte, uno de los hechos mejor demostrados en relación con el envejecimiento cerebral es la disminución de la densidad de receptores de DA en varias áreas cerebrales. En concreto, en relación con el estriado de la rata, todos los autores coinciden en describir una disminución de receptores D2 independientemente de la técnica utilizada (ver p. ej. Giorgi *et al.*, 1987; Hyttel, 1987; Han *et al.*, 1989; Morelli *et al.*, 1990; Murray y Waddington, 1991; se puede consultar la revisión de Joseph *et al.*, 1990). Más controvertida es la disminución del número de receptores D1, ya que algunos autores la describen (ver p. ej. Hyttel, 1987; Morelli *et al.*, 1990), pero otros no la detectan (ver p. ej. Murray y Waddington, 1991). En todo caso, se ha sugerido que la disminución del número de receptores de DA durante el envejecimiento se produce tanto por muerte de neuronas que expresan estos receptores (Han *et al.*, 1989) como por disminución de su síntesis en las neuronas supervivientes (Mesco *et al.*, 1991; Giorgi *et al.*, 1992).

Por otra parte, otros autores han descrito previamente que otro fenómeno obtenido tras la aplicación de apomorfina (la inhibición *in vitro* de la liberación de acetilcolina inducida por K^+) también se atenúa con el envejecimiento (Thompson *et al.*, 1984). También la conducta inducida por la administración sistémica de apomorfina a bajas dosis (que está mediada por receptores D2) disminuye durante el envejecimiento (Stoessl *et al.*, 1989).

A la vista de estos datos se puede sugerir que el deterioro de la interacción entre DA, GLU y GABA en el estriado producido por el envejecimiento se debe, fundamentalmente, a

la disminución del número de receptores de DA en este área cerebral.

2.3.4. Interacción de neurotransmisores y envejecimiento: estudios en la corteza prefrontal de la rata

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral muestran que la aplicación de apomorfina produce un aumento de las concentraciones de GLU y GABA en la corteza prefrontal de la rata joven y que tal efecto se encuentra atenuado en las ratas de edad media y viejas.

Aunque no conocemos los mecanismos por los que la apomorfina produce este aumento de GLU y GABA en la corteza prefrontal, la bibliografía nos permite sugerir que está mediado por la estimulación de los receptores de DA. A la vista de esta hipótesis, la disminución del efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU y GABA puede explicarse por una disminución de la cantidad de GLU o GABA disponible para ser liberado (por las neuronas o por las células gliales) o por una disminución de la capacidad de los receptores de DA para ser estimulados.

Tanto la bibliografía revisada como los datos presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que la cantidad de GLU y GABA liberado, tanto en condiciones basales como tras la estimulación de la liberación de estos neurotransmisores se mantiene a lo largo del envejecimiento (ver p. ej. Dawson *et al.*, 1989; Cobo *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1994; Sánchez-Prieto *et al.*, 1994; Saransaari y Oja, 1994).

Por otra parte, aunque no existen trabajos sobre la densidad de receptores de DA en la corteza prefrontal durante el envejecimiento, sí se ha descrito una disminución de la respuesta a la estimulación del receptor D1 en la corteza prefrontal de ratas viejas (Parfitt *et al.*, 1990). La bibliografía no nos permite determinar si

esta disminución en la respuesta se debe a una disminución en la densidad de estos receptores o a otras causas (p. ej. una disminución de su afinidad o alteraciones en los segundos mensajeros activados por ellos).

Con estos datos se puede sugerir que el deterioro de la interacción entre DA, GLU y GABA en la corteza prefrontal producido por el envejecimiento se debe, fundamentalmente, a la disminución de la respuesta a la estimulación de receptores de DA en este área cerebral.

CONCLUSIONES

PRIMERA

La aplicación intracerebral de apomorfina produce un aumento de la concentración extracelular de GLU en el estriado de la rata adulta joven. Sugerimos que este efecto se debe a que la apomorfina estimula receptores de DA situados en las terminaciones nerviosas glutamatérgicas y/o en las células gliales y esta activación induce la inversión del sentido del transporte de GLU.

SEGUNDA

La aplicación intracerebral de apomorfina produce un aumento de la concentración extracelular de GABA en el estriado de la rata adulta joven. Sugerimos que este efecto se debe a que la apomorfina estimula receptores de DA con efecto excitador localizados en las neuronas gabérgicas del estriado.

TERCERA

El aumento de las concentraciones de GLU y GABA en el estriado de la rata tras la aplicación de apomorfina se ve atenuado como consecuencia del proceso de envejecimiento.

La atenuación del efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU y GABA se puede atribuir a la disminución del número de receptores de DA en el estriado como consecuencia del proceso de envejecimiento.

CUARTA

La aplicación intracerebral de apomorfina produce un aumento de la concentración extracelular de GLU en la corteza prefrontal de la rata adulta joven. Sugerimos que este efecto se debe a que la apomorfina estimula receptores de DA con efecto excitador localizados en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal o en las terminaciones de las ramas recurrentes de sus axones.

QUINTA

La aplicación intracerebral de apomorfina produce un aumento de la concentración extracelular de GABA en la corteza prefrontal de la rata adulta joven. Sugerimos que este efecto se debe a que la apomorfina estimula receptores de DA con efecto excitador localizados en las neuronas gabérgicas de la corteza prefrontal.

SEXTA

El aumento de las concentraciones de GLU y GABA en la corteza prefrontal de la rata tras la aplicación de apomorfina se ve atenuado como consecuencia del proceso de envejecimiento.

La atenuación del efecto de la apomorfina sobre las concentraciones de GLU y GABA se puede atribuir a una disminución de la respuesta a la estimulación de receptores de DA en la corteza prefrontal como consecuencia del proceso de envejecimiento.

SE REALIZÓ EN EL DIA DE HOY LA LECTURA DE LA TESIS

TITULADA INTERACCION DE Neurotransmisores
y envejecimiento cerebral

DE LA QUE ES AUTOR DON Alberto

Perras Chavarino

OBTUVO POR ~~MAJORIA~~ ^{UNANIMIDAD} LA CALIFICACION DE Apto cum Laude

Madrid, 17 de Diciembre de 1996

El Presidente,

[Signature]

El Vocal 1

[Signature]

El Vocal 3

[Signature]

El Vocal 2

[Signature]

Secretario

[Signature]

BIBLIOGRAFÍA

- Adolfsson, R.; Gottfries, C.G.; Roos, B.E. & Winblad, B. (1979)** Post-mortem distribution of dopamine and homovallinic acid in human brain, variations related to age, and a review of the literature. *J. Neural Transm.* 45: 81-105.
- Algeri, S.; Bonati, M.; Brunello, N. & Ponzio, F. (1977)** Dihydropterine reductase and tyrosine hydroxylase activities in rat during development and senescence: a comparative study. *Brain Res.* 132: 569-574.
- Allison, L.A. & Shoup, R.E. (1984)** O-phthalaldehyde derivates of amines for high speed liquid chromatography electrochemistry. *Ann. Chem.* 56: 1089-1096.
- Amara, S.G. & Kuhar, M.J. (1993)** Neurotransmitter transporters: recent progress. *Ann. Rev. Neurosci.* 16: 73-93.
- Antononi, A.; Leenders, K.L.; Reist, H.; Thomann, R.; Beer, H.F. & Loecher, J. (1993)** Effect of age on D2-dopamine receptors in normal human brain measured by positron emission tomography and C-11-raclopride. *Arch. Neurol.* 50: 474-480.
- Arnsten, A.F.T. (1993)** Catecholamine mechanisms in age-related cognitive decline. *Neurobiol. Aging* 14: 639-641.
- Attwell, D.; Barbour, B. & Szatkowski, M. (1993)** Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11: 401-407.
- Attwell, D. & Mobbs, P. (1994)** Neurotransmitter transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 353-359.
- Banay-Schwartz, M.; Lajtha, A. & Palkovitz, M. (1989)** Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements I. Glutamate and related amino acids. *Neurochem. Res.* 14: 555-562.
- Barbeito, L.; Chéramy, A.; Godeheu, G.; Desce, J.M. & Glowinski, J. (1990)** Glutamate receptors of a quisqualate-kainate subtype are involved in the presynaptic regulation of dopamine release in the cat caudate nucleus in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 2: 304-311.
- Barnes, C.A.; Rao, G.; Foster, T. & McNaughton, B.L. (1992)** Region-specific

age effects on AMPA sensitivity: electrophysiological evidence for loss of synaptic contacts in hippocampal field CA1. *Hippocampus* 2: 457-468.

Baskys, A. (1992) Metabotropic receptors and "slow" excitatory actions of glutamate agonists in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 15: 92-96.

Baskys, A.; Reynolds, J.N. & Carlen, P.L. (1990) NMDA depolarizations and long-term potentiation are reduced in the aged rat neocortex. *Brain Res.* 530: 142-146.

Bean, A.J. & Roth, R.H. (1991) Effects of haloperidol administration on in vivo extracellular dopamine in striatum and prefrontal cortex after partial dopamine lesions. *Brain Res.* 549: 155-158.

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

Benveniste, H. & Diemer, N.H. (1987) Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol.* 74: 234-238.

Benveniste, H.; Drejer, J.; Schousbrou, A. & Diemer, N.H. (1987) Regional cerebral glucose phosphorylation and blood flow after insertion of a microdialysis fiber through the dorsal hippocampus of the rat. *J. Neurochem.* 49: 234-238.

Benveniste, H.; Hansen, A.J. & Ottosen, N.S. (1989) Determination of brain interstitial concentration by microdialysis. *J. Neurochem.* 52: 1741-1750.

Bernath, S. (1992) Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Prog. Neurobiol.* 38: 57-91.

Bernath, S. & Zigmond, M.J. (1988) Characterization of [3H]GABA release from

striatal slices: evidence for a calcium-independent process via the GABA uptake system. *Neuroscience* 27: 563-570.

Bernath, S. & Zigmond, M.J. (1989) Dopamine may influence striatal GABA release via three separate mechanisms. *Brain Res.* 476: 373-376.

Bertorelli, R. & Consolo, S. (1990) D1 and D2 dopaminergic regulation of acetylcholine release from striata of freely moving rats. *J. Neurochem.* 54: 2145-2148.

Besson, M.J.; Kemel, M.L.; Gauchy, C.; Girault, J.A.; Spampinato, U.; Lantin, N.; Desban, M. & Glowinski, J. (1986) In vivo measurement of [3H]GABA release: an approach to study of the regulation of GABA-containing neurons in the basal ganglia and associated structures in the cat and in the rat. En: Myers, R.D. & Knott, P. (eds.) *Neurochemical analysis of the conscious brain: voltammetry and push-pull perfusion.* *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, vol. 473. New York Academy of Sciences, New York, págs. 475-488.

Bidlingmeyer, B.A.; Cohen, S.A. & Tarvin, T.L. (1984) Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *J. Chromatogr.* 336: 93-104.

Bito, L.; Davson, H.; Levin, E.; Murray, M. & Snider, N. (1966) The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J. Neurochem.* 13: 1057-1067.

Björklund, A. & Lindvall, O. (1984) Dopamine containing systems in CNS. En: Björklund, A. & Hokfelt, T. (eds.) *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 2: Classical transmitters in the CNS.* Elsevier, Amsterdam, págs. 55-122.

- Bonanno, G. & Raiteri, M. (1993)** Multiple GABA-B receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 259-261.
- Bormann, J. (1988)** Electrophysiology of GABA A and GABA B receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11: 112-116.
- Bowery, N.G. (1993)** GABA-B receptor pharmacology. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33: 109-147.
- Bowery, N.G.; Hill, D.R.; Hudson, A.L.; Doble, A.; Middlemiss, D.N.; Shaw, J. & Turnbull, M. (1980)** (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* 283: 92-94.
- Bowery, N.G.; Hudson, A.L. & Price, G.W. (1987)** GABA-A and GABA-B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20: 365-383.
- Bradford, H.F.; Ward, H.K. & Thomas, A.J. (1978)** Glutamine: a major substrate for nerve endings. *J. Neurochem.* 30: 1453-1459.
- Brizzee, K.R. & Ordry, J.M. (1979)** Age pigments, cell loss and hippocampal function. *Mech. Ageing Dev.* 9: 143-162.
- Brody, H. (1990)** The aging brain. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 137: 40-44.
- Burt, D.R. & Kamatchi, G.L. (1991)** GABA-A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* 5: 2916-2923.
- Campbell, K.; Kalen, P.; Lundberg, C.; Wictorin, K.; Rosegren, E. & Björklund, A. (1993)** Extracellular γ -aminobutyric acid levels in the rat caudate-putamen: monitoring the neural and glial contribution by intracerebral microdialysis. *Brain Res.* 614: 241-250.
- Carlsson, M. & Carlsson, A. (1990)** Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia - implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 13: 272-276.
- Carter, C.J.; L'Heureux, R. & Scatton, B. (1988)** Differential control by N-methyl-D-aspartate and kainate of striatal dopamine release in vivo: a transstriatal dialysis study. *J. Neurochem.* 51: 462-468.
- Castorina, M.; Ambrosini, A.M.; Pacifici, L.; Ramacci, M.T. & Angelucci, L. (1994)** Age-dependent loss of NMDA receptors in hippocampus, striatum, and frontal cortex of the rat: prevention by acetyl-L-carnitine. *Neurochem. Res.* 19: 795-798.
- Chéramy, A.; Romo, R.; Godeheu, G.; Baruch, P. & Glowinski, J. (1986)** In vivo presynaptic control of dopamine release in the cat caudate nucleus. II. Facilitatory or inhibitory influence of L-glutamate. *Neuroscience* 19: 1081-1090.
- Cimino, M.; Marini, P.; Cattabeni, F. & Meldolesi, J. (1993)** [3H]-CGP 39653 Mapping of glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptors in the brain of aged rats. *Neurosci. Res. Comm.* 12: 31-39.
- Civelli, O. (1995)** Molecular biology of the dopamine receptor subtypes. En: Bloom, F.E. & Kupfer, D.J. (eds.) *Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York, págs. 155-161.
- Cobo, M. (1990)** *Aminoácidos acídicos y autoestimulación en la corteza prefrontal de la rata: estudio neurofarmacológico y neuroquímico*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Cobo, M.; Expósito, I.; Porras, A. & Mora, F. (1992)** Release of amino acid neurotransmitters in different cortical areas of conscious adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 13: 705-709.

Bibliografía

- Cobo, M.; Expósito, I. & Mora, F. (1993)** Aging, prefrontal cortex, and amino acid neurotransmitters: differential effects produced by electrical stimulation. *Neurobiol. Aging* 14: 187-190.
- Cohen, S.A. & Müller, W.E. (1992)** Age-related alterations of NMDA-receptor properties in the mouse forebrain: partial restoration by chronic phosphatidylserine treatment. *Brain Res.* 584: 174-180.
- Coleman, P.D. & Flood, D.G. (1987)** Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 8: 521-545.
- Consolo, S.; Wu, C.F.; Fiorentini, F.; Ladinsky, H. & Vezzani, A. (1987)** Determination of endogenous acetylcholine release in freely moving rats by intrastriatal dialysis coupled to a radioenzymatic assay: effect of drugs. *J. Neurochem.* 48: 1459-1465.
- Consolo, S.; Girotti, P.; Russi, G. & Di Chiara, G. (1992)** Endogenous dopamine facilitates striatal in vivo acetylcholine release by acting on D1 receptors localized in the striatum. *J. Neurochem.* 59: 1555-1557.
- Côté, L. & Crutcher, M.D. (1991)** The basal ganglia. En: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (eds.) *Principles of Neural Science*. Appleton & Lange, Norwalk, págs. 647-659.
- Cotman, C.W.; Monaghan, D.T.; Ottersen, O.P. & Storm-Mathisen, J. (1987)** Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* 10: 273-280.
- Creese, I.; Sibley, D.R.; Hamlin, M.W. & Leff, S.E. (1983)** The classification of dopamine receptors: relationship to radioligand binding. *Ann. Rev. Neurosci.* 6: 43-71.
- Curtis, D.R.; Phillis, J.W. & Watkins, J.C. (1959)** Chemical excitation of spinal neurons. *Nature* 183: 611-613.
- Daly, D.A. & Moghaddam, B. (1993)** Actions of clozapine and haloperidol on the extracellular levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex and striatum of conscious rats. *Neurosci. Lett.* 152: 61-64.
- Damsma, G.; Robertson, G.S.; Tham, C.-S. & Fibiger, H.C. (1991)** Dopaminergic regulation of striatal acetylcholine release: importance of D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 1064-1072.
- Danbolt, N.C. (1994)** The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog. Neurobiol.* 44: 377-396.
- Davis, J.M. & Himwich, W.A. (1975)** Neurochemistry of the developing and aging mammalian brain. En: Ordy, J.M. & Brizzee, K.R. (eds.) *Neurobiology of Aging*. Plenum, New York, págs. 329-357.
- Dawson, R.Jr.; Wallace, D.R. & Meldrum, M.J. (1989)** Endogenous glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. *Neurobiol. Aging* 10: 665-668.
- Dawson, R.Jr. & Wallace, D.R. (1992)** Kainic acid-induced seizures in aged rats: neurochemical correlates. *Brain Res. Bull.* 29: 459-468.
- DeBoer, P.; Damsma, G.; Schram, Q.; Stoof, J.C.; Zaagsma, J. & Westerink, B.H.C. (1992)** The effect of intrastriatal application of directly and indirectly acting dopamine agonists and antagonists on the in vivo release of acetylcholine measured by brain microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 345: 144-152.

- DeBoer, P.; Abercrombie, E.D.; Heeringa, M. & Westerink, B.H.C. (1993)** Differential effect of systemic administration of bromocriptine and L-DOPA on the release of acetylcholine from striatum of intact and 6-OHDA-treated rats. *Brain Res.* 608: 198-203.
- DeBoer, P. & Westerink, B.H.C. (1994)** GABAergic modulation of striatal cholinergic interneurons: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 62: 70-75.
- del Arco, A.; Segovia, G. & Mora, F. (1996)** Endogenous glutamate produces an increase in extracellular concentrations of dopamine, GABA, and taurine in striatum of the freely moving rat: correlational studies. En: González-Mora, J.L.; Borges, R. & Mas, M (eds.) *Monitoring molecules in Neurosciences*. Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, págs. 253-254. (Abstract)
- Di Chiara, G. & Morelli, M. (1994)** Acetylcholine, dopamine and NMDA transmission in the caudate-putamen: their interaction and function as a striatal modulatory system. En: Percheron, G.; McKenzie, J.S. & Féger, J. (eds.) *The Basal Ganglia. IV: New Ideas and Data on Structure and Function*. Plenum Press, New York, págs. 491-505.
- Di Chiara, G.; Morelli, M. & Consolo, S. (1994)** Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci.* 17: 228-233.
- Díaz, J.; Lévesque, D.; Lammers, C.H.; Griffon, N.; Martres, M.-P.; Schwartz, J.-C. & Sokoloff, P. (1995)** Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65: 731-745.
- Dimova, R.; Vuillet, J.; Nicoullon, A. & Kerkerian-Le Goff, L. (1993)** Ultrastructural features of the choline acetyltransferase-containing neurons and relationships with nigral dopaminergic and cortical afferent pathways in the rat striatum. *Neuroscience* 53: 1059-1071.
- Dluzen, D.E.; McDermott, J.L. & Ramirez, V.D. (1991)** Changes in dopamine release in vitro from the corpus striatum of young versus aged rats as a function of infusion modes of L-DOPA, potassium and amphetamine. *Exp. Neurol.* 112: 153-160.
- Dobrev, D.; Bergsträber, E.; Fischer, H.-D. & Andreas, K. (1995)** Restriction and functional changes of dopamine release in rat striatum from young adult and old rats. *Mech. Ageing Dev.* 80: 107-119.
- Donzanti, B.A. & Ung, A.K. (1990)** Alterations in neurotransmitter amino acid content in the aging rat striatum are subregion dependent. *Neurobiol. Aging* 11: 159-162.
- Donzanti, B.A.; Hite, J.F. & Yamamoto, B.K. (1993)** Extracellular glutamate levels increase with age in the lateral striatum - potential involvement of presynaptic D-2 receptors. *Synapse* 13: 378-382.
- Einarsson, S.; Josefsson, B. & Lagerkvist, S. (1983)** Determination of amino acids with 9-fluoroenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 282: 609-618.
- Esclapez, M.; Campistron, G. & Trottier, S. (1987)** Immunocytochemical localization and morphology of GABA-containing neurons in the prefrontal and frontoparietal cortex of the rat. *Neurosci. Lett.* 77: 131-136.
- Expósito, I.; Sanz, B.; Porrás, A. & Mora, F. (1994)** Effects of apomorphine and L-Methionine sulphoximine on the release of excitatory amino acid neurotransmitters and glutamine in the striatum of the conscious rat. *Eur. J. Neurosci.* 6: 287-291.

Bibliografia

- Fagg, G.E. & Foster, A.C. (1983)** Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9: 701-719.
- Farooqui, A.A. & Horrocks, L.A. (1991)** Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res. Rev.* 16: 171-191.
- Feenstra, M.G.P.; van der Weij, W. & Botterblom, M.H.A. (1995)** Concentration-dependent dual action of locally applied N-methyl-D-aspartate on extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex in vivo. *Neurosci. Lett.* 201: 175-178.
- Finch, C.E. & Morgan, D.G. (1990)** RNA and protein metabolism in the aging brain. *Ann. Rev. Neurosci.* 13: 75-87.
- Fonnum, F. (1984)** Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42: 1-11.
- Fonnum, F. (1993)** Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 60: 47-57.
- Fonnum, F.; Storm-Mathisen, J. & Divac, I. (1981)** Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and cortico-thalamic fibres in rat brain. *Neuroscience* 6: 863-873.
- Fornieles, F.; Peinado, J.M. & Mora, F. (1986)** Endogenous levels of amino acid neurotransmitters in different regions of frontal and temporal cortex of the rat during the normal process of aging. *Neurosci. Lett. [Suppl.]* 26: 150. (Abstract)
- Freeman, G.B. & Gibson, G.E. (1987)** Selective alteration of mouse brain neurotransmitter release with age. *Neurobiol. Aging* 8: 147-152.
- Friedemann, M.N. & Gerhardt, G.A. (1992)** Regional effects of aging on dopaminergic function in the Fischer-344 rat. *Neurobiol. Aging* 13: 325-332.
- Fuxe, K. & Agnati, L.F. (eds.) (1991)** *Volume Transmission in the Brain: Novel Mechanisms for Neural Transmission*. Raven Press, New York.
- Fykse, E.M. & Fonnum, F. (1988)** Uptake of γ -aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *J. Neurochem.* 50: 1237-1242.
- Gaddum, J.H. (1961)** Push-pull cannulae. *J. Physiol.* 120: 1P-2P.
- Gardner, E.L.; Chen, J. & Paredes, W. (1993)** Overview of chemical sampling techniques. *J. Neurosci. Methods* 48: 173-197.
- Gilad, G.M.; Gilad, V.H. & Tizabi, Y. (1990)** Aging and stress-induced changes in choline and glutamate uptake in hippocampus and septum of two rats strains differing in longevity and reactivity to stressors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8: 709-713.
- Giorgi, O.; Demontis, G.; Porceddu, M.L.; Mele, S.; Calderini, G.; Toffano, G. & Biggio, G. (1987)** Developmental and age-related changes in D1-dopamine receptors and dopamine content in the rat striatum. *Dev. Brain Res.* 35: 283-290.
- Giorgi, O.; Pibiri, M.G.; Dal Toso, R. & Ragatou, G. (1992)** Age-related changes in turnover rates of D1-dopamine receptors in the retina and distinct areas of the rat brain. *Brain Res.* 569: 323-329.
- Girault, J.A.; Barbeito, L.; Spampinato, U.; Gozlan, H.; Glowinski, J. & Besson, M.J. (1986a)** In vivo release of endogenous amino acids from the rat striatum: further evidence for a role of glutamate and aspartate in

- corticostriatal neurotransmission. *J. Neurochem.* 47: 98-106.
- Girault, J.A.; Spampinato, U.; Glowinski, J. & Besson, M.J. (1986b)** In vivo release of [3H]gamma-aminobutyric acid in the rat neostriatum. II. Opposing effects of D1 and D2 dopamine receptor stimulation in the dorsal caudate putamen. *Neuroscience* 19: 1109-1117.
- Godefroy, F.; Bassant, M.H.; Weil-Fugazza, J. & Lamour, Y. (1989)** Age-related changes in dopaminergic and serotonergic indices in the rat forebrain. *Neurobiol. Aging* 10: 187-190.
- Godukhin, O.V.; Zharikova, A.D. & Budantsev, A.Y. (1984)** Role of presynaptic dopamine receptors in regulation of the glutamatergic neurotransmission in rat neostriatum. *Neuroscience* 12: 377-383.
- Goldstein, M. (1995)** Long- and short-term regulation of tyrosine hydroxylase. En: Bloom, F.E. & Kupfer, D.J. (eds.) *Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress.* Raven Press, New York, págs. 187-195.
- Gonzales, R.A.; Brown, L.M.; Jones, T.W.; Trent, R.D.; Westbrook, S.L. & Leslie, S.W. (1991)** N-methyl-D-aspartate mediated responses decrease with age in Fisher 344 rat brain. *Neurobiol. Aging* 12: 219-225.
- Gonzalez-Mora, J.L.; Guadalupe, T.; Fumero, B. & Mas, M. (1991)** Mathematical resolution of mixed in vivo voltammetry signals. Models, equipment, assessment by simultaneous microdialysis sampling. *J. Neurosci. Meth.* 39: 231-244.
- Grace, A.A. (1991)** Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41: 1-24.
- Greenfield, A.S.; Chéramy, A. & Glowinski, J. (1983)** Evoked release of proteins from central nervous system in vivo. *J. Neurochem.* 40: 1048-1057.
- Gruen, R.J.; Friedhoff, A.J.; Coale, A. & Moghaddam, B. (1992)** Tonic inhibition of striatal dopamine transmission: effects of benzodiazepine and GABA-A receptor antagonists on extracellular dopamine levels. *Brain Res.* 599: 51-56.
- Gutierrez, A.; Khan, Z.U.; Morris, S.J. & De Blas, A.L. (1994)** Age-related decrease of GABA-A receptor subunits and glutamic acid decarboxylase in the rat inferior colliculus. *J. Neurosci.* 14: 7469-7477.
- Han, Z.; Kuyatt, B.L.; Kochman, K.A.; DeSouza, E.B. & Roth, G.S. (1989)** Effect of aging on concentrations of D2-receptor-containing neurons in rat striatum. *Brain Res.* 488: 299-307.
- Hanbauer, Y.; Wink, D.; Osawa, Y.; Edelman, G.M. & Gally, J.A. (1992)** Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport* 3: 409-412.
- Hansen, L.A.; Armstrong, D.M. & Terry, R.D. (1987)** An immunohistochemical quantification of fibrous astrocytes in the aging human cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* 8: 1-6.
- Hansson, E. (1991)** Transmitter receptors on astroglial cells. En: Fuxe, K. & Agnati, L.F. (eds.) *Volume Transmission in the Brain: Novel Mechanisms for Neural Transmission.* Raven Press, New York, págs. 257-265.
- Hayashi, T.A. (1952)** Physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinic. *Jpn. J. Physiol.* 3: 46-64.

Bibliografía

- Herranz, A.S.; Lerma, J. & Martín del Río, R. (1984)** Determination of γ -aminobutyric acid in physiological samples by simple, rapid high performance liquid chromatography method. *J. Chromatogr.* 309: 139-144.
- Herranz, A.S.; Cristin, J.L.R.; Lerma, J. & Martín del Río, R. (1985)** Incremento de sensibilidad en los análisis por CLAE de los OPA-aminoácidos usando como reactivo de derivación el ácido 3-mercaptopropiónico. *Resúmenes de la reunión científica anual del Grupo de cromatografía y técnica afines* 58-59. (Abstract)
- Heumann, D. & Leuba, G. (1983)** Neuronal death in the development and aging of the cerebral cortex of the mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 9: 297-311.
- Hollmann, M. & Heinemann, S. (1994)** Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 31-108.
- Houser, C.R.; Crawford, G.D.; Barber, R.P.; Salvaterra, P.M. & Vaughn, J.E. (1983)** Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res.* 266: 97-119.
- Houser, C.R.; Crawford, G.D.; Salvaterra, P.M. & Vaughn, J.E. (1985)** Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J. Comp. Neurol.* 234: 17-34.
- Hösli, E. & Hösli, L. (1986)** Binding sites for 3H-dopamine and dopamine-antagonists on cultured astrocytes of rat striatum and spinal cord: an autoradiographic study. *Neurosci. Lett.* 65: 177-182.
- Hyttel, J. (1987)** Age related decrease in the density of dopamine D1 and D2 receptors in corpus striatum of rats. *Pharmacol. Toxicol.* 61: 126-129.
- Imperato, A. & Di Chiara, G. (1988)** Effects of locally applied D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists studied with brain dialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 156: 385-393.
- Imperato, A.; Honoré, T. & Jensen, L.H. (1990)** Dopamine release in the nucleus caudatus and in the nucleus accumbens is under glutamatergic control through non-NMDA receptors: a study in freely-moving rats. *Brain Res.* 530: 223-228.
- Jedema, H.P. & Moghaddam, B. (1996)** Characterization of excitatory amino acid modulation of dopamine release in the prefrontal cortex of conscious rats. *J. Neurochem.* 66: 1448-1453.
- Jolles, J. (1986)** Cognitive, emotional and behavioral dysfunctions in aging and dementia. En: Swaab, D.F.; Fliers, E.; Mirmiran, M.; Van Gool, W.A. & Van Haaren, F. (eds.) *Aging of the Brain and Alzheimer's Disease*. Elsevier, Amsterdam, págs. 15-39.
- Jones, B.N.; Paabo, S. & Stein, S. (1981)** Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthalaldehyde precolumn labelling procedure. *J. Liquid Chromatogr.* 4: 575-586.
- Joseph, J.A.; Berger, R.A.; Engel, B.T. & Roth, G.S. (1978)** Age-related changes in the nigrostriatum: a behavioral and biochemical analysis. *J. Gerontol.* 33: 643-649.
- Joseph, J.A.; Dalton, T.K. & Hunt, W.A. (1988)** Age-related decrements in muscarinic enhancement of K⁺-evoked release of endogenous striatal dopamine: an indicator of altered cholinergic-dopaminergic reciprocal inhibitory control in senescence. *Brain Res.* 454: 140-148.

- Joseph, J.A.; Roth, G.S. & Strong, R. (1990)** The striatum. A microcosm for the examination of age-related alterations in the CNS: a selected review. *Rev. Biol. Res. Aging* 4: 181-199.
- Joyce, J.N.; Loeshen, S.K.; Sapp, D.W. & Marshall, J.F. (1986)** Age-related regional loss of caudate-putamen dopamine receptors revealed by quantitative autoradiography. *Brain Res.* 378: 209-218.
- Joyce, J.N. & Marshall, J.F. (1987)** Quantitative autoradiography of dopamine D2 sites in rat caudate-putamen: localization to intrinsic neurons and not to neocortical afferents. *Neuroscience* 20: 773-795.
- Justice, J.B. & Neill, D.B. (1986)** Interpretation of voltammetry in vivo using dialyzed perfusions. En: Myers, R.D. & Knott, P. (eds.) *Neurochemical analysis of the conscious brain: voltammetry and push-pull perfusion. Ann.N.Y.Acad.Sci., vol. 473.* New York Academy of Sciences, New York, págs. 170-187.
- Kametani, H.; Iijima, S.; Spangler, E.L.; Ingran, D.K. & Joseph, J.A. (1995)** In vivo assessment of striatal dopamine release in the aged male Fischer 344 rat. *Neurobiol. Aging* 16: 639-646.
- Kandel, E.R. (1991)** Disorders of thought: schizophrenia. En: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (eds.) *Principles of Neural Science.* Appleton & Lange, Norwalk, págs. 853-868.
- Katzman, R. & Terry, R. (1992)** Normal aging of the nervous system. En: Katzman, R. & Rowe, J.W. (eds.) *Principles of Geriatric Neurology.* F.A.Davis, Philadelphia, págs. 18-58.
- Kebabian, J.W. & Calne, D.B. (1979)** Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93-96.
- Keefe, K.A.; Zigmond, M.J. & Abercrombie, E.D. (1992)** Extracellular dopamine in striatum: influence of nerve impulse activity in medial forebrain bundle and local glutamatergic input. *Neuroscience* 47: 325-332.
- Keefe, K.A.; Sved, A.F.; Zigmond, M.J. & Abercrombie, E.D. (1993a)** Stress-induced dopamine release in the neostriatum: evaluation of the role of action potentials in nigrostriatal dopamine neurons or local initiation by endogenous excitatory amino acids. *J. Neurochem.* 61: 1943-1952.
- Keefe, K.A.; Zigmond, M.J. & Abercrombie, E.D. (1993b)** In vivo regulation of extracellular dopamine in the neostriatum: influence of impulse activity and local excitatory amino acids. *J. Neural Transm. [Gen. Sect.]* 91: 223-240.
- Kissinger, P.T.; Hart, J.B. & Adams, R.N. (1973)** Voltammetry in brain tissue - a new neurophysiological measurement. *Brain Res.* 55: 209-213.
- Kita, H. (1993)** GABAergic circuits of the striatum. En: Arbuthnott, G.W. & Emson, P.C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, págs. 51-72.
- Knox, C.A. (1982)** Effects of aging and chronic arterial hypertension on the cell populations in the neocortex and archicortex of the rat. *Acta Neuropathol.* 56: 139-145.
- Korf, J. & Venema, K. (1985)** Amino acids in rat striatal dialysates: methodological aspects and changes after electroconvulsive shock. *J. Neurochem.* 45: 1341-1348.
- Kornhuber, J. & Kornhuber, M.E. (1983)** Axo-axonic synapses in the rat striatum. *Eur. Neurol.* 22: 433-436.
- Kornhuber, J. & Kornhuber, M.E. (1986)** Presynaptic dopaminergic modulation of

Bibliografia

cortical input to the striatum. *Life Sci.* 39: 669-674.

Koshikawa, N.; Kikuchi de Beltrán, K.; Tomiyama, K.; Kobayashi, M. & Cools, A.R. (1991) Functional interaction between dopamine D1 and D2 receptors in rat jaw movements. *Eur. J. Pharmacol.* 201: 47-51.

König, J.F.R. & Klippel, R.A. (1967) *The Rat Brain*. R.E. Krieger, New York.

Kötter, R. (1994) Postsynaptic integration of glutamatergic and dopaminergic signals in the striatum. *Prog. Neurobiol.* 44: 163-196.

Krnjévić, K. & Schwartz, S. (1966) Is γ -aminobutyric acid an inhibitory neurotransmitter? *Nature* 211: 1372-1374.

Lai, J.C.K.; Leung, T.K.C. & Lim, L. (1981) Brain regional distribution of glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase, and acetylcholinesterase in the rat: effects of chronic manganese chloride administration after two years. *J. Neurochem.* 36: 1443-1448.

Landfield, P.W.; Braun, L.D.; Pitler, T.A.; Lindsey, J.D. & Lynch, G. (1981) Hippocampal aging in rats: a morphometric study of multiple variables in semithin sections. *Neurobiol. Aging* 2: 265-275.

Lannes, B. & Micheletti, G. (1994) Glutamate-dopamine balance in the striatum: pre- and post-synaptic interactions. En: Percheron, G.; McKenzie, J.S. & Féger, J. (eds.) *The Basal Ganglia. IV: New Ideas and Data on Structure and Function*. Plenum Press, New York, págs. 475-491.

Lapper, S.R. & Bolam, J.P. (1992) Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51: 533-545.

Law-Tho, D.; Hirsch, J.C. & Crepel, F. (1994) Dopamine modulation of synaptic transmission in rat prefrontal cortex: an in vitro electrophysiological study. *Neurosci. Res.* 21: 151-160.

Le Moine, C.; Tison, F. & Bloch, B. (1990) D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat caudate-putamen: existence of two cell populations. *Neurosci. Lett.* 117: 248-252.

Le Moine, C.; Normand, E. & Bloch, B. (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4205-4209.

Levi, G. & Raiteri, M. (1993) Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci.* 16: 415-419.

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

Lindroth, P. & Mopper, K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amount amino acids by precolumn fluorescence derivation with OPA. *Ann. Chem.* 51: 1667-1674.

Lindvall, O. & Björklund, A. (1974) The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glioxalic acid fluorescence method. *Acta. Physiol. Scand.* 412: 4-48.

Lippa, A.S.; Critchett, D.J.; Ehlert, F.; Yamamura, H.I.; Enna, S.J. & Bartus, R.T. (1981) Age-related alterations in neurotransmitter receptors: an electrophysiological and biochemical analysis. *Neurobiol. Aging* 2: 3-8.

- MacDonald, R.L. & Olsen, R.W. (1994)** GABA-A receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 569-602.
- MacKay, A.V.P.; Yates, C.M.; Wright, A.; Hamilton, P. & Davies, P. (1978)** Regional distribution of monoamines and their metabolites in the human brain. *J. Neurochem.* 30: 841-848.
- Magnusson, K.R. & Cotman, C.W. (1993a)** Effects of aging on NMDA and MK-801 binding sites in mice. *Brain Res.* 604: 334-337.
- Magnusson, K.R. & Cotman, C.W. (1993b)** Age-related changes in excitatory amino acids receptors in two mouse strains. *Neurobiol. Aging* 14: 197-206.
- Marotta, C.A.; Majocha, R.E.; Coughlin, J.F.; Manz, H.J.; Davis, P.; Ventosa-Michelman, M.; Chow, W.-G.; Zain, S.B. & Sajdel-Sulkowska, E.M. (1986)** Transcriptional and translational regulatory mechanisms during normal aging of the mammalian brain and Alzheimer's disease. En: Swaab, D.F.; Fliers, E.; Mirmiran, M.; Van Gool, W.A. & Van Haaren, F. (eds.) *Aging of the Brain and Alzheimer's Disease*. Elsevier, Amsterdam, págs. 303-320.
- Marshall, J.F. & Altar, C.A. (1986)** Striatal dopamine uptake and swim performance of the aged rat. *Brain Res.* 379: 112-117.
- Marshall, J.F. & Rosenstein, A.J. (1990)** Age-related decline in rat striatal dopamine metabolism is regionally homogeneous. *Neurobiol. Aging* 11: 131-137.
- Martin, D.L. & Rimvall, K. (1993)** Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 60: 395-407.
- Martínez, R.; del Arco, A. & Mora, F. (1996)** Amphetamine increases the extracellular concentrations of glutamate and taurine in striatum of the conscious rat: studies on Ca^{2+} , Na^{+} , and glutamate transporter mechanisms. *J. Physiol.* 493P: 198. (Abstract)
- Martínez-Fong, D.; Rosales, M.G.; Gongora-Alfaro, J.L.; Hernandez, S. & Aceves, J. (1992)** NMDA receptor mediates dopamine release in the striatum of unanesthetized rats as measured by brain microdialysis. *Brain Res.* 595: 309-315.
- Martínez-Hernández, A.; Bell, K.R. & Norenberg, M.D. (1977)** Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195: 1356-1358.
- Maura, G.; Giardi, A. & Raiteri, M. (1988)** Release-regulating D-2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 680-684.
- McGeer, E.G.; Fibiger, H.C.; McGeer, P.L. & Wickson, V. (1971)** Aging and brain enzymes. *Exp. Gerontol.* 6: 391-396.
- McGeer, P.L. & McGeer, E.G. (1989)** Amino acid neurotransmitters. En: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W. & Molinoff, P.B. (eds.) *Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York, págs. 311-332.
- McIntosh, F.C. & Oborin, P.E. (1953)** Release of acetylcholine from intact cerebral cortex. *XIX International Physiological Congress* 580-581. (Abstract)
- Meldrum, M.J.; Glenton, P. & Dawson, R.Jr. (1992)** [^3H]D-aspartic acid release in brain slices of adult and aged Fisher 344 rats. *Neurochem. Res.* 17: 151-156.
- Mesco, E.R.; Joseph, J.A.; Blake, M.J. & Roth, G.S. (1991)** Loss of D2 receptors during aging is partially due to decreased levels of mRNA. *Brain Res.* 545: 355-357.
- Meyer, D.K. (1991)** Nonexocytotic release of γ -aminobutyric acid: implications for volume transmission. En: Fuxe, K. & Agnati, L.F.

(eds.) *Volume Transmission in the Brain: Novel Mechanisms for Neural Transmission*. Raven Press, New York, págs. 433-440.

Miyoshi, R.; Kito, S.; Doudou, N. & Nomoto, T. (1991) Influence of age on N-methyl-D-aspartate antagonist binding sites in the rat brain studied by in vitro autoradiography. *Synapse* 8: 212-217.

Moghaddam, B. & Gruen, R.J. (1991) Do endogenous excitatory amino acids influence striatal dopamine release? *Brain Res.* 544: 329-330.

Molinoff, P.B. & Axelrod, J. (1971) Biochemistry of catecholamines. *Ann. Rev. Biochem.* 40: 465-500.

Mora, F. & Myers, R.D. (1984) Regional synthesis of ¹⁴C-amino acids in cerebral cortex of the unanesthetized rat: simultaneous analysis by push-pull perfusion. *Brain Res. Bull.* 13: 421-426.

Mora, F. & Porras, A. (1993) Effects of amphetamine on the release of excitatory amino acid neurotransmitters in the basal ganglia of the conscious rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 348-351.

Mora, F. & Porras, A. (1994) Interactions of dopamine, excitatory amino acids, and inhibitory amino acids in the basal ganglia of the conscious rat. En: Percheron, G.; McKenzie, J.S. & Féger, J. (eds.) *The Basal Ganglia. IV: New Ideas and Data on Structure and Function*. Plenum Press, New York, págs. 441-447.

Mora, F.; Sweeny, K.F.; Rolls, E.T. & Sanguinetti, A.M. (1976) Spontaneous firing rate of neurons in prefrontal cortex of the rat: evidence for a dopaminergic inhibition. *Brain Res.* 116: 519-522.

Morari, M.; O'Connor, W.T.; Ungerstedt, U. & Fuxe, K. (1993) N-methyl-D-aspartic acid differentially regulates extracellular dopamine, GABA, and glutamate levels in the dorsolateral neostriatum of the halothane-anesthetized rat: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 60: 1884-1893.

Morari, M.; O'Connor, W.T.; Ungerstedt, U. & Fuxe, K. (1994) Dopamine D1 and D2 receptor antagonism differentially modulates stimulation of striatal neurotransmitter levels by N-methyl-D-aspartic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 256: 23-30.

Morelli, M.; Mennini, T.; Cagnotto, A.; Toffano, G. & Di Chiara, G. (1990) Quantitative autoradiographical analysis of the age-related modulation of central dopamine D1 and D2 receptors. *Neuroscience* 36: 403-410.

Morgan, B.G.; Marcusson, J.O.; Nyberg, P.; Wester, P.; Winblad, B.; Gordon, M.N. & Finch, C.E. (1987) Divergent changes in D1 and D2 dopamine binding sites in human brain during aging. *Neurobiol. Aging* 8: 195-201.

Mufson, E.J. & Stein, D.G. (1980) Behavioral and morphological aspects of aging: an analysis of rat frontal cortex. En: Stein, D.G. (ed.) *The Psychobiology of Aging: Problems and Perspectives*. Elsevier, New York, págs. 99-125.

Mugnaini, E. & Oertel, W.H. (1985) An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. En: Björklund, A. & Hökfelt, T. (eds.) *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 4: GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I*. Elsevier, Amsterdam, págs. 436-608.

- Murray, A.M. & Waddington, J.L. (1991)** Age-related changes in the regulation of behaviour by D1:D2 dopamine receptor interactions. *Neurobiol. Aging* 12: 431-435.
- Myers, R.D. (1972)** Methods for perfusing different structures of the brain. En: Myers, R.D. (ed.) *Methods in Psychobiology*. Academic Press, London, págs. 169-211.
- Myers, R.D. (1986)** Development of push-pull systems for perfusion of anatomical distinct regions of the brain of the awake animal. En: Myers, R.D. & Knott, P. (eds.) *Neurochemical analysis of the conscious brain: voltammetry and push-pull perfusion*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, vol. 473. New York Academy of Sciences, New York, págs. 21-41.
- Naito, S. & Ueda, T. (1985)** Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44: 99-109.
- Najlerahim, A.; Francis, P.T. & Bowen, D.M. (1990)** Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. *Neurobiol. Aging* 11: 155-158.
- Nakanishi, S. (1992)** Molecular diversity of glutamate receptor and implications for brain function. *Science* 258: 597-603.
- Nakanishi, S. (1994)** Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13: 1031-1037.
- Nicholls, D.G. (1989)** Release of glutamate, aspartate, and γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 52: 331-341.
- Nicholls, D.G. (1993)** The glutamatergic nerve terminal. *Eur. J. Biochem.* 212: 613-631.
- Nicholls, D.G. & Attwell, D. (1990)** The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 462-468.
- Nichols, N.R.; Day, J.R.; Laping, N.J.; Johnson, S.A. & Finch, C.E. (1993)** GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol. Aging* 14: 421-429.
- Nieoullon, A.; Kerkerian, L. & Dusticier, N. (1982)** Inhibitory effects of dopamine on high affinity glutamate uptake from rat striatum. *Life Sci.* 30: 1165-1172.
- Nishijima, K.; Kashiva, A. & Nishikawa, T. (1994)** Preferential stimulation of extracellular release of dopamine in rat frontal cortex to striatum following competitive inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Neurochem.* 63: 375-378.
- O'Boyle, K.M. & Waddington, J.L. (1984)** Loss of rat striatal dopamine receptors with aging is selective for the D2 but not D1 sites: association with increased non-specific binding of the D1 ligand $+[3H]piflutixol$. *Eur. J. Pharmacol.* 105: 171-174.
- O'Callaghan, J.P. & Miller, D.B. (1991)** The concentration of glial fibrillary acidic protein increases with age in the mouse and the rat brain. *Neurobiol. Aging* 12: 171-174.
- Ogden, G. & Foldi, P. (1986)** Amino acid analysis: an overview of current methods. *Liquid Chromatogr. Gas Chromatogr.* 5: 28-40.
- Orrego, F. & Villanueva, S. (1993)** The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience* 56: 539-555.
- Ottersen, O.P. & Storm-Mathisen, J. (1984)** Glutamate and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J. Comp. Neurol.* 229: 374-429.
- Palmer, A.M.; Robichaud, P.J. & Reiter, C.T. (1994)** The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol. Aging* 15: 103-111.

Bibliografía

- Parent, A. & Hazrati, L.-N. (1995)** Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.* 20: 91-127.
- Pehok, E.A. & Yamamoto, B.K. (1994)** Differential effects of locally administered clozapine and haloperidol on dopamine efflux in the rat prefrontal cortex and caudate putamen. *J. Neurochem.* 63: 2118-2124.
- Peinado, J.M.; McAnus, K.T. & Myers, R.D. (1986)** Rapid method for micro-analysis of endogenous amino acid neurotransmitters in brain perfusates in the rat by isocratic HPLC-EC. *J. Neurosci. Methods* 18: 269-276.
- Pende, M.; Lanza, M.; Bonanno, G. & Raiteri, M. (1993)** Release of endogenous glutamic and aspartic acids from cerebrocortex synaptosomes and its modulation through activation of a γ -aminobutyric acid B (GABA-B) receptor subtype. *Brain Res.* 604: 325-330.
- Peters, A.; Harriman, K.M. & West, C.D. (1987)** The effect of increased longevity, produced by dietary restriction, on the neuronal population of area 17 in rat cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* 8: 7-20.
- Peterson, C. & Cotman, C.W. (1989)** Strain-dependent decrease in glutamate binding to the N-methyl-D-aspartic acid receptor during aging. *Neurosci. Lett.* 104: 309-313.
- Piggott, M.A.; Perry, E.K.; Perry, R.H. & Court, J.A. (1992)** [³H]MK-801 binding to the NMDA receptor complex, and its modulation in human frontal cortex during development and aging. *Brain Res.* 588: 277-286.
- Pin, J.-P. & Duvoisin, R. (1995)** The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34: 1-26.
- Pirot, S.; Godboud, R.; Mantz, J.-P.; Tassin, J.; Glowinski, J. & Thierry, A.-M. (1992)** Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience* 49: 857-865.
- Ponzio, F.; Brunello, N. & Algeri, S. (1978)** Catecholamine-synthesis in brain of the ageing rat. *J. Neurochem.* 30: 1617-1620.
- Ponzio, F.; Calderini, G.; Lomuscio, G.; Vantini, G.; Toffano, G. & Algeri, S. (1982)** Changes in monoamines and their metabolite levels in some brain regions of aged rats. *Neurobiol. Aging* 3: 23-29.
- Porrás, A. (1992)** *Correlación entre los niveles extracelulares de ácido aspártico y serina en corteza prefrontal y ganglios basales de la rata determinados por la técnica de perfundido intracerebral in vivo.* Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Porrás, A. & Mora, F. (1993)** Dopamine receptor antagonist blocks the release of glycine, GABA, and taurine produced by amphetamine. *Brain Res. Bull.* 31: 305-310.
- Porrás, A. & Mora, F. (1995)** Dopamine-glutamate-GABA interactions and aging: studies in the striatum of the conscious rat. *Eur. J. Neurosci.* 7: 2138-2188.
- Porrás, A. & Mora, F. (1996)** Glutamate and brain aging. *J. Physiol.* 493P: 568. (Abstract)
- Porrás, A. & Mora, F.** Glutamate and aging of the brain. *Biobehav. Brain Rev.* (enviado)
- Porrás, A.; Sanz, B. & Mora, F.** Dopamine-glutamate-GABA interactions in the prefrontal cortex of the conscious rat: studies on aging. *Mech. Ageing Dev.* (enviado)

- Porter, T.G. & Martin, D.L. (1984)** Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by γ -aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 43: 1464-1467.
- Pradhan, S.N. (1980)** Central neurotransmitters and aging. *Life Sci.* 26: 1643-1656.
- Price, M.T.; Olney, J.W. & Haft, R. (1981)** Age-related change in glutamate concentration and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. *Life Sci.* 28: 1365-1370.
- Rao, G.; Barnes, C.A. & McNaughton, B.L. (1993)** Effects of age on L-glutamate-induced depolarization in three hippocampal subfields. *Neurobiol. Aging* 14: 27-33.
- Raza, A.; Milbrandt, J.C.; Arneric, S.P. & Caspary, D.M. (1994)** Age-related changes in brainstem auditory neurotransmitters: measures of GABA and acetylcholine function. *Hear Res.* 77: 221-230.
- Retaux, S.; Besson, M.J. & Penit-Soria, J. (1991a)** Opposing effects of dopamine D2 receptor stimulation on the spontaneous and the electrically evoked release of [3H]GABA on rat prefrontal cortex slices. *Neuroscience* 42: 61-71.
- Retaux, S.; Besson, M.J. & Penit-Soria, J. (1991b)** Synergism between D1 and D2 dopamine receptors in the inhibition of the evoked release of [3H]GABA in the rat prefrontal cortex. *Neuroscience* 43: 323-329.
- Rinne, J.O. (1987)** Brain muscarinic and dopaminergic receptors in the aging human brain. *Brain Res.* 404: 162-168.
- Rinne, J.O.; Lönnberg, P. & Marjamäki, P. (1990)** Age-dependent decline in human brain dopamine D1 and D2 receptors. *Brain Res.* 508: 349-352.
- Robinson, D.S.; Sourkes, T.L.; Nies, A.; Harris, L.S.; Spector, S.; Bartlett, D.L. & Kaye, I.S. (1977)** Monoamine metabolism in human brain. *Arch. Gen. Psychiatry* 34: 89-92.
- Rose, G.M.; Gerhardt, G.A.; Conboy, G.L. & Hoffer, B.J. (1986)** Age-related alterations in monoamine release from rat striatum: an in vivo electrochemical study. *Neurobiol. Aging* 7: 77-82.
- Roth, R.H. (1984)** Dopamine autoreceptors: distribution, pharmacology and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 430: 27-53.
- Rothstein, J.D.; Dykes-Hoberg, M.; Pardo, C.A.; Bristol, L.A.; Jin, L.; Kunczi, R.W.; Kanai, Y.; Hediger, M.A.; Wang, Y.; Schielke, J.P. & Welty, D.F. (1996)** Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-688.
- Sabel, B.A. & Stein, D.G. (1981)** Extensive loss of subcortical neurons in the aging rat brain. *Exp. Neurol.* 73: 507-516.
- Samochocki, M. & Strosznajder, J. (1994)** Age-related changes of GABA-activated chloride channel properties in brain cortex synaptic plasma membrane: evidence for phospholipase involvement. *J. Neurochem.* 63: 1522-1528.
- Santiago, M.; Machado, A. & Cano, J. (1993a)** Effects of age and dopamine agonists and antagonists on striatal dopamine release in the rat: an in vivo microdialysis study. *Mech. Ageing Dev.* 67: 261-267.
- Santiago, M.; Machado, A. & Cano, J. (1993b)** In vivo release of dopamine from rat striatum, substantia nigra and prefrontal cortex: differential modulation by baclofen. *Br. J. Pharmacol.* 109: 814-818.
- Sanz, B. (1995)** *Interacción de neurotransmisores en la corteza prefrontal: estudios en la*

Bibliografía

rata despierta. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Sanz, B.; Expósito, I. & Mora, F. (1993) Effects of neurotensin on the release of glutamic acid in the prefrontal cortex and striatum of the rat. *Neuroreport* 4: 1194-1196

Saransaari, P. & Oja, S.S. (1994) Regulation of D-aspartate release by glutamate and GABA receptors in cerebral cortical slices from developing and ageing mice. *Neuroscience* 60: 191-198.

Saransaari, P. & Oja, S.S. (1995) Age-related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Mech. Ageing Dev.* 81: 61-71.

Sánchez-Prieto, J.; Herrero, I.; Miras-Portugal, M.T. & Mora, F. (1994) Unchanged exocytotic release of glutamic acid in cortex and neostriatum of the rat during aging. *Brain Res. Bull.* 33: 357-359.

Scheel-Krüger, J. (1986) Dopamine-GABA interactions, evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and the limbic system. *Acta Neurol. Scand.* 73, Suppl. 107: 1-49.

Schmidt, W.J.; Bubser, M. & Hauber, W. (1992) Behavioural pharmacology of glutamate in the basal ganglia. *J. Neural Transm.* Suppl.38: 65-89.

Schoepp, D.D. & Conn, P.J. (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 13-20.

Schwartz, E.A. (1987) Depolarization without calcium can release γ -aminobutyric acid from a retina neuron. *Science* 238: 350-354.

Segovia, G.; Porrás, A. & Mora, F. (1994) Differential effects of nitric oxide on glutamate

and GABA release in neostriatum and CA1 area of hippocampus in the conscious rat. *Neuroreport* 5: 1937-1940.

Segovia, G.; Porrás, A. & Mora, F. (1996a) Effects of 4-aminopyridine and L-trans-pyrrolidine-3,4-dicarboxylic acid on extracellular concentrations of glutamate and taurine in striatum of the freely moving rat. *J. Physiol.* 493P: 19S-20S. (Abstract)

Segovia, G.; del Arco, A. & Mora, F. (1996b) Endogenous glutamate, through NMDA and AMPA receptors, differentially mediates increases dopamine, GABA, and taurine in striatum of the freely moving rat: correlational studies. En: González-Mora, J.L.; Borges, R. & Mas, M (eds.) *Monitoring molecules in Neurosciences*. Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, págs. 251-252. (Abstract)

Seiden, L.S.; Sabol, K.E. & Ricaurte, G.A. (1993) Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 639-677.

Serra, M.; Ghiani, C.A.; Foddi, M.C.; Motzo, C. & Biggio, G. (1994) NMDA receptor functions is enhanced in the hippocampus of aged rats. *Neurochem. Res.* 19: 483-487.

Séguéla, P.; Watkins, K.C. & Descarries, L. (1988) Ultrastructural features of dopamine axon terminals in the antero-medial and suprarhinal cortex of adult rat. *Brain Res.* 441: 11-22.

Sherwood, R.A. (1990) Amino acid measurement by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J. Neurosci. Methods* 34: 17-22.

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

- Sieghart, W. (1992)** GABA-A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 446-450.
- Sieghart, W. (1995)** Structure and pharmacology of γ -amino butyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* 47: 181-234.
- Smith, A.D. & Bolam, J.P. (1990)** The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci.* 13: 259-265.
- Sohal, R.S. & Wolfe, L.S. (1986)** Lipofuscin: characteristics and significance. En: Swaab, D.F.; Fliers, E.; Mirmiran, M.; Van Gool, W.A. & Van Haaren, F. (eds.) *Aging of the Brain and Alzheimer's Disease*. Elsevier, Amsterdam, págs. 171-183.
- Sprengel, R. & Seeburg, P.H. (1993)** The unique properties of glutamate receptor channels. *FEBS Lett.* 325: 90-94.
- Stoessl, A.J.; Martin-Iverson, M.T.; Barth, T.M.; Dourish, C.T. & Iversen, S.D. (1989)** Effects of ageing on the behavioural responses to dopamine agonists: decreased yawning and locomotion, but increased stereotypy. *Brain Res.* 495: 20-30.
- Stoof, J.C.; De Boer, T.; Sminia, P. & Mulder, A.H. (1982)** Stimulation of D2-dopamine receptors in rat neostriatum inhibits the release of acetylcholine and dopamine but does not affect the release of γ -aminobutyric acid, glutamate or serotonin. *Eur. J. Pharmacol.* 84: 211-214.
- Stoof, J.C.; Drukarch, B.; DeBoer, P.; Westerink, B.H.C. & Gronewegen, H.J. (1992)** Regulation of the activity of striatal cholinergic neurons by dopamine. *Neuroscience* 47: 755-770.
- Strolin Benedetti, M. & Dostert, P. (1989)** Monoamine oxidase, brain ageing and degenerative diseases. *Biochem. Pharmacol.* 38: 555-561.
- Strolin Benedetti, M.; Cini, M.; Fusi, R.; Marrari, P. & Dostert, P. (1990)** The effects of aging on MAO activity and amino acid levels in rat brain. *J. Neural Transm. [Suppl.]* 29: 259-268.
- Strolin Benedetti, M.; Ruso, A.; Marrari, P. & Dostert, P. (1991)** Effects of aging of the content in sulphur-containing amino acids in rat brain. *J. Neural Transm. [Gen. Sect.]* 86: 191-203.
- Strong, R.; Samorajski, T. & Gottesfeld, Z. (1982)** Regional mapping of neostriatal neurotransmitter systems as a function of aging. *J. Neurochem.* 39: 831-836.
- Strong, R.; Samorajski, T. & Gottesfeld, Z. (1984)** High-affinity uptake of neurotransmitters in rat neostriatum: effects of aging. *J. Neurochem.* 43: 1766-1768.
- Surmeier, D.J.; Reiner, A.; Levine, M.S. & Ariano, M.A. (1993)** Are neostriatal dopamine receptors co-localized? *Trends Neurosci.* 16: 299-305.
- Szatkowski, M.; Barbour, B. & Attwell, D. (1990)** Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348: 443-446.
- Tamaru, M.; Yoneda, Y.; Ogita, K.; Shimizu, J. & Nagata, Y. (1991)** Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 542: 83-90.
- Terry, R.D. (1986)** Interrelations among the lesions of normal and abnormal aging of the brain. En: Swaab, D.F.; Fliers, E.; Mirmiran, M.; Van Gool, W.A. & Van Haaren, F. (eds.)

Bibliografía

Aging of the Brain and Alzheimer's Disease. Elsevier, Amsterdam, págs. 41-48.

Thierry, A.-M.; Blanc, G.; Sobel, A.; Stinus, L. & Glowinski, J. (1973) Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science* 182: 499-501.

Thierry, A.M.; Ledouarin, C.; Penit, J.; Ferron, A. & Glowinsky, J. (1986) Variation in the ability of neuroleptics to block the inhibitory influence of dopaminergic neurons on the activity of cells in rat prefrontal cortex. *Brain Res.* 416: 155-160.

Thompson, J.M.; Whitaker, J.R. & Joseph, J.A. (1981) [3H]Dopamine accumulation and release from striatal slices in young, mature and senescent rats. *Brain Res.* 224: 436-440.

Thompson, J.M.; Makino, C.L.; Whitaker, J.R. & Joseph, J.A. (1984) Age-related decrease in apomorphine modulation of acetylcholine release from rat striatal slices. *Brain Res.* 299: 169-173.

Tossman, U. & Ungerstedt, U. (1986) The effect of apomorphine and pergolide on the potassium-evoked overflow of GABA in rat striatum studied by microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 123: 295-298.

Trugman, J.M.; Geary, W.A.II & Wooten, G.F. (1986) Localization of D-2 dopamine receptors to intrinsic striatal neurones by quantitative autoradiography. *Nature* 323: 267-269.

Turgeon, S.M. & Albin, R.L. (1994) GABA-B binding sites in early adult and aging rat brain. *Neurobiol. Aging* 15: 705-711.

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

Van Dyck, C.H.; Seibyl, J.P.; Malison, R.T.; Laruelle, M.; Wallace, E.; Zoghbi, S.S.; Zea-Ponce, Y.; Baldwin, R.M.; Charney, D.S. & Hoffer, P.B. (1995) Age-related decline in striatal dopamine transporter binding with iodine-123-beta-CITSPECT. *J. Nucl. Med.* 36: 1175-1181.

Van Eden, C.G.; Hoorneman, E.M.D.; Buigs, R.M.; Matthijssen, M.; Geffard, M. & Uylings, H.B.M. (1987) Immunocytochemical localization of dopamine in the prefrontal cortex of the rat at the light and electron microscopical level. *Neuroscience* 22: 849-862.

Vázquez, M.T.; Prados, J.; Puerta, A.J. & Mora, F. (1992) Increase of astrocyte population in the medial prefrontal cortex of the rat during aging. *Eur. J. Neurosci. Suppl.* 5: 100. (Abstract)

Venema, K.; Leever, W.; Bakker, J.O.; Haayer, G. & Korf, J. (1983) Automated precolumn derivatization device to determine neurotransmitters and other amino acids by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 260: 371-376.

Venero, J.L.; Machado, A. & Cano, J. (1991) Turnover of dopamine and serotonin and their metabolites in the striatum of the aged rats. *J. Neurochem.* 56: 1940-1948.

Verney, C.; Alvarez, C.; Geffard, M. & Berger, B. (1990) Ultrastructural double-labeling study of dopamine terminals and GABA-containing neurons in rat intermedial cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* 2: 960-972.

Vezzani, A.; Ungerstedt, U.; French, E.D. & Schwarcz, R. (1985) In vivo brain dialysis of amino acids and simultaneous EEG measurements following intrahippocampal quinolinic acid injection: evidence for a

- dissociation between neurochemical changes and seizures. *J. Neurochem.* 45: 335-344.
- Volkow, N.D.; Fowler, J.S.; Wang, G.J.; Logan, J.; Schlyer, D.; MacGregor, R.; Hitzemann, R. & Wolf, A.P. (1994)** Decreased dopamine transporters with age in health human subjects. *Ann. Neurol.* 36: 237-239.
- Vuillet, J.; Kerkerian, L.; Kachidian, P.; Bosler, O. & Nieoullon, A. (1989)** Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibres and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 100: 99-104.
- Wachtel, S.R.; Xiu-TiHu, ; Galloway, M.P. & White, F.J. (1989)** D1 dopamine receptor stimulation enables the postsynaptic, but not autoreceptor, effects of D2 dopamine agonists in nigrostriatal and mesoaccumbens dopamine systems. *Synapse* 4: 327-346.
- Wallace, D.R. & Dawson, R.Jr. (1990)** Effect of age and monosodium-L-glutamate (MSG) treatment on neurotransmitter content in brain regions from male Fischer-344 rats. *Neurochem. Res.* 15: 889-898.
- Watanabe, H. (1987)** Differential decrease in the rate of dopamine synthesis in several dopaminergic neurons of aged rat brain. *Exp. Gerontol.* 22: 17-25.
- Wedzony, K.; Golembiowska, K. & Klimek, V. (1993)** MK-801-induced symptoms of sensitization. The lack of correlation with the extracellular concentration of dopamine in the rat prefrontal cortex. *Brain Res.* 625: 333-336.
- Weiner, N. & Molinoff, P.B. (1989)** Catecholamines. En: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W. & Molinoff, P.B. (eds.) *Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York, págs. 233-252.
- Wenk, G.L.; Walker, L.C.; Price, D.L. & Cork, L.C. (1991)** Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the brains of aged rats and monkeys. *Neurobiol. Aging* 12: 93-98.
- Westerink, B.H.C. & Justice, J.B. (1991)** Microdialysis compared with other in vivo release methods. En: Robinson, T.E. & Justice, J.B. (eds.) *Microdialysis in the neurosciences*. Elsevier, Amsterdam, págs. 23-43.
- Wheeler, D.D. (1980)** Aging of membrane transport mechanisms in the central nervous system-high affinity glutamic acid transport in rat cortical synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 15: 265-284.
- Wheeler, D.D. & Ondo, J.G. (1986)** Time course of the aging of the high affinity L-glutamate transporter in rat cortical synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 21: 159-168.
- Wu, J-Y. (1976)** Purification, characterization, and kinetic studies of GAD and GABA-T from mouse brain. En: Roberts, E.; Chase, T.N. & Tower, D.B. (eds.) *GABA in Nervous System Function*. Raven Press, New York, págs. 7-55.
- Yaksh, T.L. & Yamamura, H.I. (1974)** Factors affecting performance of the push-pull cannula in brain. *J. Applied Physiol.* 37: 428-434.
- Yamamoto, B.K. & Davy, S. (1992)** Dopaminergic modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis. *J. Neurochem.* 58: 1736-1742.
- Yoshida, M.; Mizoguchi, K.; Yokoo, H.; Tanaka, T.; Ishii, H.; Emoto, H.; Koga, C. & Tanaka, M. (1993)** Muscimol-induced increase in dopamine release and metabolism is not observed in kainic acid-lesioned striatum of conscious rats: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.* 162: 5-8.
- Young, A.M.J. & Bradford, H.F. (1993)** N-methyl-D-aspartate releases γ -aminobutyric

Bibliografia

acid from rat striatum in vivo: a microdialysis study using a novel preloading method. *J. Neurochem.* 60: 487-492.

Yu, A.C.H.; Hertz, L.; Norenberg, M.D.; Syková, E. & Waxman, S. (1992) *Neuronal-astrocytic interactions*. Elsevier, Amsterdam.

Yung, K.K.L.; Bolam, J.P.; Smith, A.D.; Hersch, S.M.; Ciliax, B.J. & Levey, A.I.

(1995) Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65: 709-730.

Zocchi, A. & Pert, A. (1993) Increases in striatal acetylcholine by SKF-38393 are mediated through D1 dopamine receptors in striatum and not the frontal cortex. *Brain Res.* 627: 186-192.