

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**RITMOS CIRCADIANOS Y NEUROTRANSMISORES:
ESTUDIOS EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA
RATA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Blanca Márquez de Prado García

Bajo la dirección del Doctor:

Francisco Mora Teruel

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2475-2

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**RITMOS CIRCADIANOS Y NEUROTRANSMISORES:
ESTUDIOS EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA**

A handwritten signature in black ink, reading 'Blanca' with a stylized flourish below it.

BLANCA MÁRQUEZ DE PRADO GARCÍA
MADRID, JUNIO 2004



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
Teléfono +34 91 394 1439
Fax +34 91 394 1628
E-mail: dfisiohu@eucmos.sim.ucm.es
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

D. FRANCISCO MORA TERUEL, Catedrático de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral “Ritmos circadianos y neurotransmisores: estudios en la corteza prefrontal de la rata”, que presenta Dña. BLANCA MÁRQUEZ DE PRADO GARCÍA para optar al Grado de Doctor ha sido realizada bajo su dirección.

Madrid a 3 de Mayo de 2004

Dr. Francisco Mora

Llegados a este punto en el que uno tiene la satisfacción de ver sobre el papel el trabajo de varios años, es casi imposible no echar la vista atrás y darse cuenta de toda la gente que ha estado ahí poniendo su granito de arena, de una u otra manera. Quisiera dar las gracias a todos ellos.

Al Dr. Mora por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su Laboratorio, por su confianza en mis capacidades y por su apoyo en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, los que están y los que ya no, por los buenos momentos que hemos pasado juntos y por los ánimos: A Gregorio y Alberto por tener siempre un hueco para discutir sobre mi trabajo a pesar de que no estuviera tan relacionado con el vuestro, he aprendido mucho de vosotros. A Ledia, por su apoyo. A Ángela, en esta tesis hay un montón de trabajo tuyo también y gracias por tu conversación recién llegada a las 8 de la mañana cuando yo ya me subía por las paredes. A Concha, por la cantidad de veces que me has echado una mano con los papeles. A Macu, por los tés de cuando en cuando.

A mis compañeros de allá, por enseñarme otra manera de trabajar: gracias Andy, Irfan, Raph, Adisa, Penny y Jamison. Y gracias Nastasha, Dary, Sharon y Gail, entre todos me hicisteis sentir casi como en casa.

A mi familia, porque me ha apoyado en todo momento. A mi padre por el apoyo logístico. A mi madre por la correcciones “en prensa”. A mis hermanos, María y Javier, por los ánimos. A mis abuelos, tíos, primos...

A mis amigos que, sobre todo últimamente, han aguantado con muy buena cara todas las deserciones. Gracias Laura, Gus, Patri, Luis, Laura, Paco, Miren ... por las risas, las cañas, las cenas y el apoyo desde más cerca o más lejos. Gracias Fran y Ángel, por seguir ahí, por poder juntarnos de vez en cuando y arreglar el mundo.

A Luis, por estar ahí, darme ánimos, cuidarme, en fin gracias por ser mi compañero de aventuras.

Gracias a todos.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Ritmos circadianos	1
1.1. Ritmos biológicos: definición y clasificación	
1.2. Aspectos evolutivos	
1.3. Importancia biológica y aplicaciones de los ritmos biológicos	
1.4. Ritmos circadianos: reloj endógeno en mamíferos	
1.5. La luz: el principal sincronizador externo del ritmo circadiano	
1.6. La melatonina: el mensajero del núcleo supraquiasmático	
1.7. Ritmos circadianos y envejecimiento	
2. Corteza Prefrontal	15
2.1. Anatomía	
2.2. Conexiones	
2.3. Neuroquímica de la corteza prefrontal	
3. Neurotransmisores	19
3.1. Glutamato	19
3.1.1. Neurotransmisión glutamatérgica	
. Metabolismo del glutamato	
. Almacenamiento, liberación e inactivación	
. Receptores	
. Vías glutamatérgicas	
3.1.2. Glutamato y Ritmos Circadianos	
3.2. GABA	23
3.2.1. Neurotransmisión GABAérgica	
. Metabolismo del GABA	
. Almacenamiento, liberación e inactivación	
. Receptores	
. Vías GABAérgicas	
3.2.2. GABA y ritmos circadianos	

3.3. Dopamina	27
3.3.1. Neurotransmisión dopaminérgica	
. Metabolismo de la dopamina	
. Almacenamiento, liberación e inactivación	
. Receptores	
. Vías dopaminérgicas	
3.3.2. Dopamina y ritmos circadianos	
3.4. Acetilcolina	32
3.4.1. Neurotransmisión colinérgica	
. Metabolismo de la acetilcolina	
. Almacenamiento, liberación e inactivación	
. Receptores	
. Vías colinérgicas	
3.4.2. Acetilcolina y ritmos circadianos	
<u>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</u>	37
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	40
<u>RESULTADOS</u>	
BLOQUE EXPERIMENTAL 1	62
Estudio de los ritmos circadianos de neurotransmisores en Corteza Prefrontal y de actividad motora de la rata despierta.	
I. Introducción	
II. Material y Métodos	
III. Resultados	
IV. Discusión	

BLOQUE EXPERIMENTAL 2 69

Efecto de los cambios en el ciclo oscuridad/luz sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en Corteza Prefrontal y de actividad motora de la rata despierta.

- I. Introducción
- II. Material y Métodos
- III. Resultados
- IV. Discusión

BLOQUE EXPERIMENTAL 3 80

Estudio de los ritmos circadianos de acetilcolina y colina en Corteza Prefrontal y de actividad motora de la rata despierta.

- I. Introducción
- II. Material y Métodos
- III. Resultados
- IV. Discusión

BLOQUE EXPERIMENTAL 4 86

Efecto de la perfusión de local de melatonina en Corteza Prefrontal sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores y actividad motora de la rata despierta.

- I. Introducción
- II. Material y Métodos
- III. Resultados
- IV. Discusión

BLOQUE EXPERIMENTAL 5 99

Efecto del proceso de envejecimiento sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en Corteza Prefrontal y de actividad motora de la rata despierta. Estudio comparativo con los ganglios basales.

- I. Introducción
- II. Material y Métodos
- III. Resultados
- IV. Discusión

<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	142
1. Acerca de los métodos	142
1.1. Sobre la microdiálisis cerebral.	
1.2. Sobre el análisis cromatográfico.	
1.3. Sobre las concentraciones extracelulares de neurotransmisores medidas mediante la técnica de microdiálisis.	
2. Acerca de los resultados	146
2.1. Sobre el origen y regulación de los ritmos circadianos de neurotransmisores en la corteza prefrontal.	
2.2. Sobre la relación entre los ritmos circadianos de neurotransmisores en la corteza prefrontal y el ritmo circadiano de actividad motora	
2.3. Sobre el efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en corteza prefrontal y ganglios basales y de actividad motora.	
<u>CONCLUSIONES</u>	152
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	153

Abreviaturas:

ACh	acetilcolina
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
ATP	adenosin trifosfato
CHO	colina
COMT	catecol-o-metiltransferasa
DA	dopamina
DAG	diacilglicerol
DOPAC	ácido dihidroxifenilacético
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAD	ácido glutámico descarboxilasa
GLU	glutamato
GMPC	guanosin monofosfato cíclico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución (high performance liquid chromatography)
HVA	ácido homovalínico
IP3	inositol trifosfato
KA	kainato
LCRs	líquido cefalorraquídeo sintético
L-DOPA	3,4- dihidroxi-L-fenilalanina
MAO	mono-amino-oxidasa
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSQ	núcleo supraquiasmático
REM	rapid eye movements
TTX	tetrodotoxina
VIP	peptido vasointestinal
VTA	área tegmental ventral

Introducción

1. RITMOS BIOLÓGICOS

La rotación y traslación de la tierra dotan al medio que nos rodea de una ritmicidad en las condiciones de luz y temperatura. Estos cambios conllevan una serie de comportamientos como las migraciones, la reproducción estacional o el ajuste del periodo de actividad al periodo óptimo del día. Esta dependencia temporal de la conducta tienen detrás una compleja regulación fisiológica que lleva a una mejor adaptación de los organismos al medio en el que viven.

1.1. RITMOS BIOLÓGICOS : DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

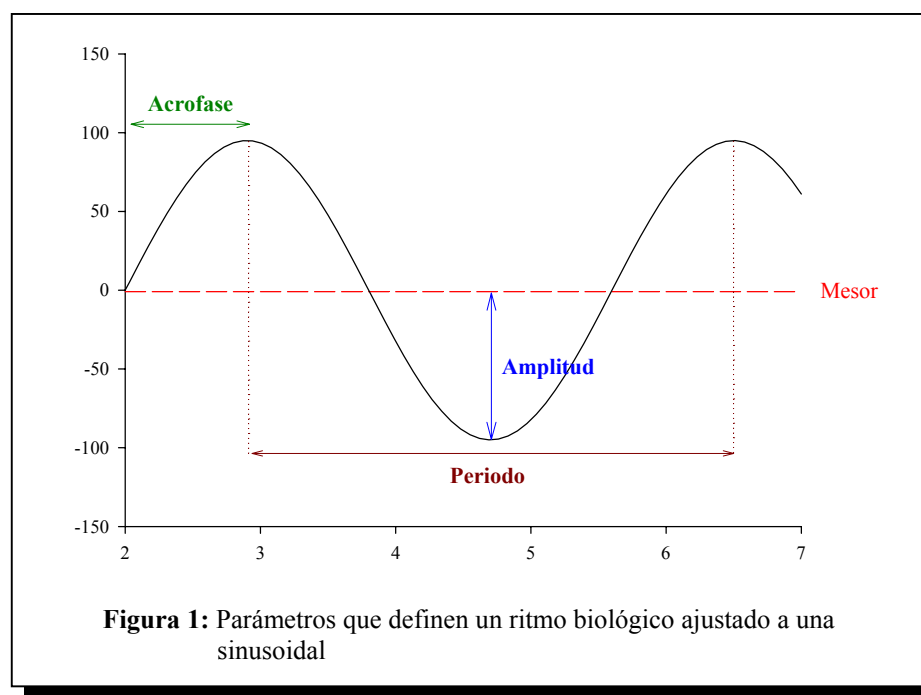
Se conoce como “ritmos biológicos” a la recurrencia de fenómenos dentro de un sistema biológico con intervalos regulares (Mora y Sanguinetti, 2004). Estos ritmos suponen una adaptación frente al medio. Sus características están determinadas genéticamente. Y, una vez establecidos, son generados por el propio organismo independientemente de las variables externas, son endógenos (García Fernández, 1998). De hecho, en condiciones constantes de luz y temperatura los ritmos manifiestan su frecuencia intrínseca (frecuencia en curso libre). Según su frecuencia en curso libre los ritmos biológicos se clasifican en (García Fernández, 1998):

- Ritmos de frecuencia alta (periodo en curso libre < 30 min.). Por ejemplo: latido cardiaco, la frecuencia respiratoria o la actividad del cerebro medida mediante electroencefalograma.
- Ritmos de frecuencia media (periodo en curso libre entre 30 min. y 6 días):
 - Ritmos ultradianos (entre 30 min. y 20 h). Como las fases del sueño de ondas lentas y sueño paradójico.
 - Ritmos circamareales (aproximadamente 12 h). La actividad de las especies costeras presenta una ritmicidad circamareal.
 - Ritmos circadianos (20-28 h). El ciclo sueño-vigilia, la actividad motora, la liberación de melatonina y la temperatura presentan patrones rítmicos circadianos.
 - Ritmos infradianos (28 h-6 días). Por ejemplo, el nivel de las hormonas de la glándula suprarrenal tiene ritmo infradiano.
- Ritmos de frecuencia baja (periodo en curso libre > 6 días)
 - Ritmos circalunares (aproximadamente 29 días). La menstruación y la reproducción en animales de zona intermareal se dan con ritmos circalunares.
 - Ritmos circanuales (aproximadamente 365 días). Presentan un patrón de ritmicidad circanual la migración, la reproducción en especies de reproducción estacional, la hibernación y la estivación.

Muchos de estos ritmos coexisten dentro del mismo organismo. La interacción entre ritmos de distintas frecuencias puede determinar la aparición rítmica de ciertos eventos fisiológicos. Por ejemplo la variación rítmica de los niveles de cortisol o de la hormona adenocorticotropa son el reflejo de la interacción de ritmos circadianos y ultradianos (Haus et al., 1998).

Los componentes de un ritmo biológico se pueden analizar mediante una función sinusoidal. Los parámetros que definen un ritmo son los siguientes (García Fernández J.M):

- El *Periodo*, es el intervalo de tiempo entre dos puntos iguales de ritmo.
- El *valor medio o mesor*, es la media aritmética de todos los valores obtenidos dentro de un ciclo. Es el valor alrededor del que oscila la variable.
- La *amplitud*, es la diferencia entre el valor máximo (o mínimo) y el valor medio de una oscilación.
- La *fase*, es el valor de una variable en un momento dado. Para caracterizar la fase normalmente se determina la *acrofase* o el momento en el que la variable alcanza el valor máximo. La representación de las acrofases de los distintos ritmos se denomina *mapa de fases* e indica la relación temporal entre los distintos procesos fisiológicos, apareciendo con una secuencia característica dentro de un ciclo.



1.2. ASPECTOS EVOLUTIVOS

Los ritmos biológicos se encuentran presentes a lo largo de toda la escala filogenética. Los organismos unicelulares, tanto procariotas como eucariotas ya presentan procesos rítmicos en muchas de sus actividades: la tasa de crecimiento de bacterias, la contracción pulsátil de la vesícula contráctil en paramecios, la bioluminiscencia de algunos dinoflagelados... (Sansvives, 1989) En el reino vegetal los procesos de floración, polinización, crecimiento

foliar, la apertura de flores, el movimiento y orientación de las hojas, son procesos rítmicos (Meijer y Rietveld, 1989). Los invertebrados pluricelulares poseen igualmente múltiples patrones rítmicos que determinan su periodo de desarrollo, reproducción, alimentación, etc.... desde sus periodos iniciales de vida. En el caso de los insectos, por ejemplo, el periodo de desarrollo desde larva hasta adulto está marcado por multitud de eventos cíclicos (Sansvives, 1989). En vertebrados hay descritos multitud de procesos rítmicos como la motilidad, la reproducción, procesos de muda y de migración (Tellería, 1987).

Existen evidencias fósiles de ritmos diarios en el Devónico (394 m.a.) en corales y a finales del Ordovícico (420 m.a.) en nautiloides. Estos organismos tenían un ritmo de crecimiento en capas en las conchas o esqueletos coralinos controlado por la luz. Los corales muestran, además, anillos de crecimiento anual.

Algunos autores remontan la aparición de los ritmos a 3500 m.a. cuando la tierra no estaba protegida por una capa de ozono de los efectos dañinos de los rayos ultravioleta. Postulan que las células primigenias no hubieran sobrevivido mucho tiempo si no hubieran desarrollado una organización temporal que restringiera a la noche los procesos sensibles a la luz ultravioleta (Brady, 1979).

La hipótesis más aceptada sobre el origen de los ritmos biológicos postula que, inicialmente, los ciclos diarios de luz, temperatura y humedad habrían sido los agentes más importantes para su aparición. Más adelante, las actividades rítmicas de predadores y competidores aportarían presión selectiva al proceso organizador circadiano. Los ritmos biológicos evolucionaron como adaptación a los ciclos diarios y estacionales del ambiente y como adaptación a la disponibilidad de alimentos y a las condiciones ambientales (Brady, 1979).

1.3. IMPORTANCIA BIOLÓGICA Y APLICACIONES DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

La organización temporal de procesos fisiológicos internos y de eventos bioquímicos celulares es fundamental ya que muchos de ellos son dependientes entre sí y no sólo necesitan un espacio común sino simultaneidad en el tiempo. Por ello es importante el carácter endógeno de los ritmos independientemente de las fluctuaciones ambientales.

Dentro de la naturaleza existen cambios impredecibles y cambios predecibles. Estos últimos ocurren con una frecuencia determinada, son cambios fluctuantes. La organización temporal de las funciones del organismo permite activar mecanismos efectores antes del cambio ambiental, en el caso de cambios fluctuantes. Esta anticipación permite responder con la máxima eficacia a dichos cambios suponiendo un menor gasto de energía, es lo que se llama homeostasis predictiva (Kandel, 1997; Cardinali, 1999).

Los ritmos diarios permiten ordenar ciertas actividades según sus limitaciones diarias (termorregulación en reptiles, humedad en anfibios,...) o sus peculiares estrategias de búsqueda de alimento, refugio, etc. (Tellería, 1987; Gisolfi y Mora, 2000).

Los ritmos estacionales ordenan comportamientos más específicos como la reproducción o la migración y, en condiciones extremas de temperatura o disponibilidad de alimento, inducen estrategias como la hibernación o el letargo (Tellería, 1987; Gisolfi y Mora, 2000).

El estudio de los ritmos biológicos nos puede ayudar a conocer mejor muchas patologías, sobre todo las crónicas, que se manifiestan con más intensidad a determinadas horas: la úlcera péptica, las crisis asmáticas, ataques de epilepsia, subidas de presión arterial, cefaleas (García Fernández, 1998); y los trastornos relacionados con alteraciones en la ritmicidad del organismo como son el jet lag, la depresión estacional o algunos tipos de insomnio (García Fernández, 1998). Conocer la ritmicidad de cada patología así como los mecanismos que regulan esa ritmicidad, es fundamental para el tratamiento de dichas patologías.

Por ser el cuerpo humano un sistema rítmico, el momento en que se administra un fármaco influye en su absorción, metabolismo, duración de sus efectos, excreción, acciones colaterales, toxicidad, así como en su eficacia (García Fernández, 1998). La cronofarmacología es la parte de la farmacología que se ocupa del estudio de todas estas variables y su reto es llegar a diseñar medicamentos que actúen justo en el momento en el que son más efectivos.

1.4. RITMOS CIRCADIANOS: RELOJ ENDÓGENO EN MAMÍFEROS

Cuando amanece las funciones de nuestro organismo se aceleran, anticipándose al aumento de actividad física que se aproxima. Las fases del ciclo vigilia-sueño en el adulto humano, la actividad motora espontánea, la temperatura corporal, niveles intracelulares de electrolitos como el Ca^{2+} , los niveles de hormonas como el cortisol o la melatonina siguen un ritmo biológico de entre 20-28 horas, esto es un ritmo circadiano (García Fernández, 1998).

Dentro de un organismo, cada célula, cada tejido, cada órgano tiene su propia ritmicidad (Brady, 1979). Estos ritmos deben estar coordinados para el buen funcionamiento del organismo. Existe una jerarquía entre los distintos ritmos, y el encargado de coordinarlos sería el marcapasos principal o reloj endógeno.

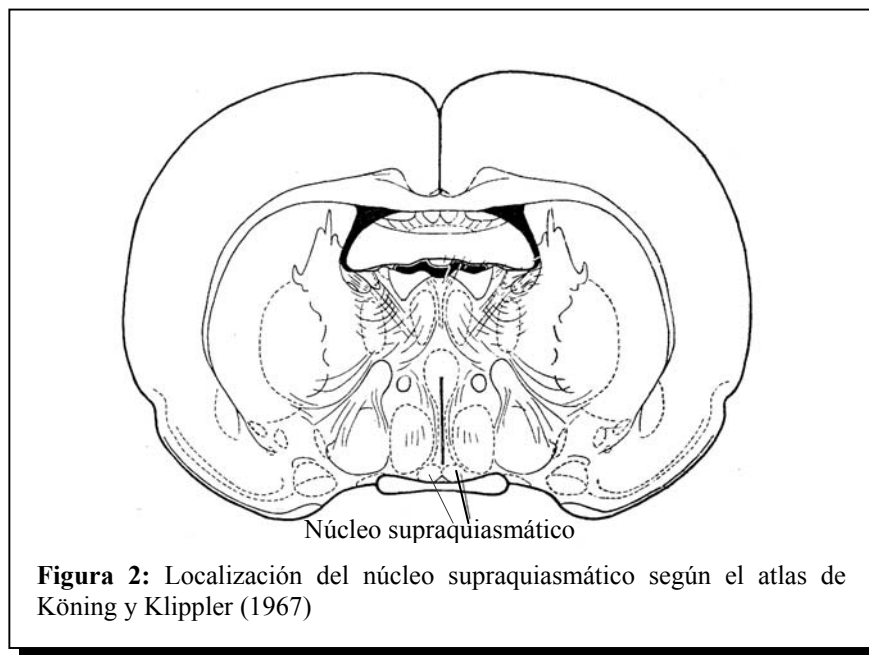
Un reloj endógeno circadiano presenta dos propiedades fundamentales (Albers et al., 1992):

1. Está genéticamente programado con un ciclo de una longitud cercana a las 24 horas. Este ciclo se observa en animales mantenidos en condiciones constantes de oscuridad y temperatura, y se denomina ritmo en curso libre porque manifiesta el ritmo intrínseco. Este ritmo intrínseco varía según las especies pero nunca se desvía de las 24 horas más de unas pocas horas.

2. Puede ser sincronizado con el ciclo de 24 horas noche-día. La luz puede sincronizar el ciclo adelantándolo o atrasándolo hasta hacerlo coincidir con el ciclo de 24 horas noche-día.

En mamíferos, el reloj endógeno se localiza en el hipotálamo ventral más precisamente en el núcleo supraquiasmático. La lesión de este núcleo produce una pérdida de los ritmos circadiano comportamiento y funciones fisiológicas como por ejemplo de actividad motora, ciclo sueño/vigilia, ingesta de comida y bebida, temperatura y secreción hormonal, en varias especies de mamíferos, incluido el hombre (Moore y Eichler, 1972; Kafka et al., 1985; Meijer y Rietveld, 1989; Albers et al., 1992; Moore y Leak, 2001). Estos ritmos se recuperan al transplantar tejido del núcleo supraquiasmático (Ralph et al., 1990). El núcleo supraquiasmático presenta ritmicidad circadiana en la utilización de glucosa y en la actividad

eléctrica de sus neuronas (Meijer y Rietveld, 1989; Albers et al., 1992), que se mantiene al aislar este núcleo del resto de las áreas cerebrales (Moore y Leak, 2001).

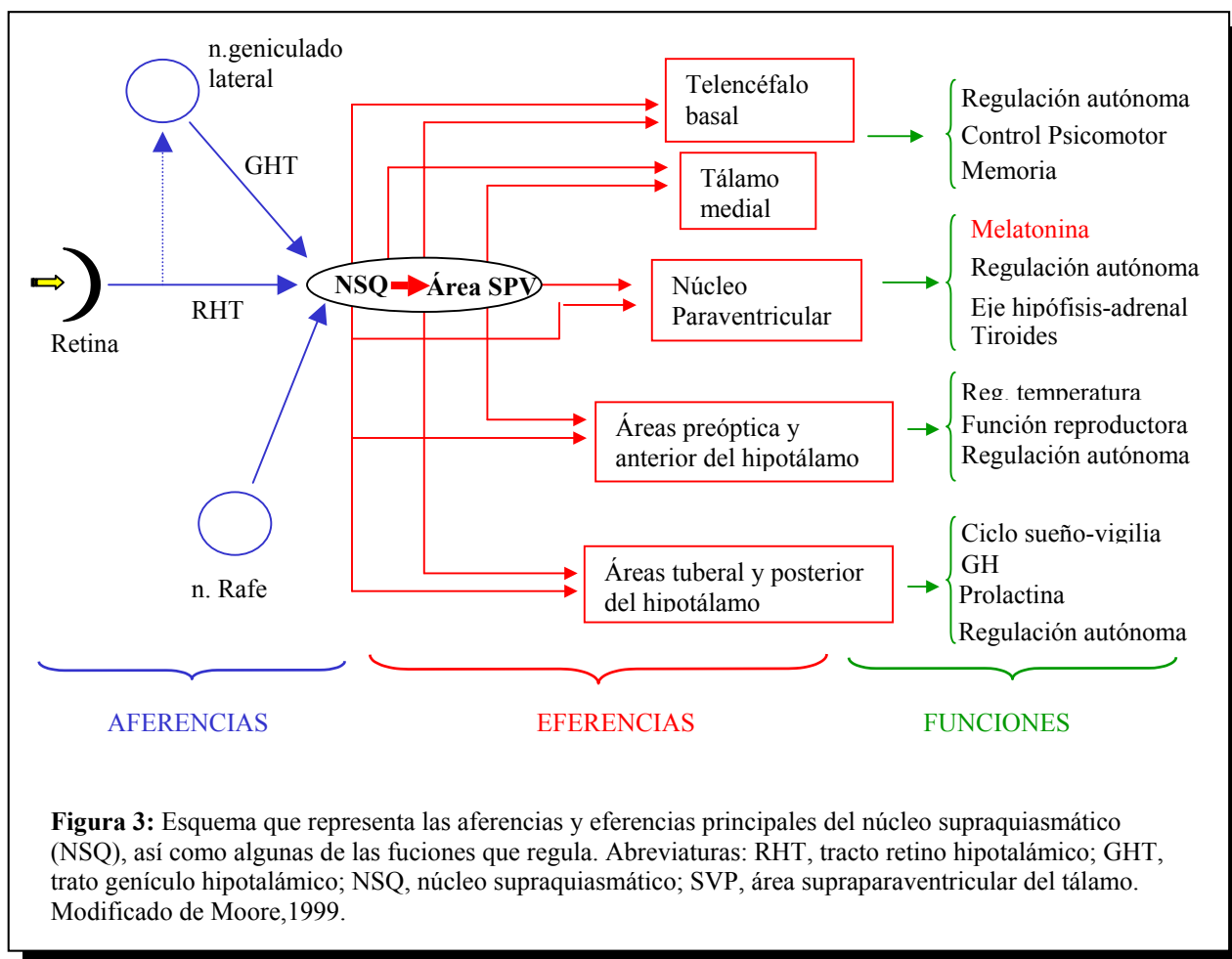


Este núcleo sería el marcapasos principal existiendo osciladores secundarios en núcleos del hipotálamo anterior (núcleo paraventricular hipotalámico) y del hipotálamo tuberal (núcleo paraventricular talámico y el núcleo septal lateral). Estos núcleos reciben conexiones directas desde el marcapasos principal (García Fernández, 1998).

El núcleo supraquiasmático recibe 3 aferencias principales (Miller et al., 1996; García Fernández, 1998; Moore 1999):

- los fotorreceptores de la retina proyectan directamente al núcleo supraquiasmático a través del tracto retino hipotalámico. Esta vía nerviosa lleva la información lumínica y media la sincronización de su actividad con el medio externo. Los neurotransmisores que median la acción de las neuronas de tracto retinohipotalámico son el glutamato y aspartato (Miller et al., 1996; García Fernández, 1998; Moore 1999).
- el tracto retino hipotalámico envía colaterales al núcleo intergeniculado lateral, que a su vez inerva el núcleo supraquiasmático a través del tracto genículohipotalámico. Las neuronas del núcleo geniculado lateral contienen principalmente neuropéptido Y. Se ha sugerido que el núcleo geniculado lateral integra información lumínica y no lumínica para el sistema de sincronización circadiana que modula la función del núcleo supraquiasmático (Moore, 1999)
- las neuronas serotoninérgicas provenientes de los núcleos mesencefálicos del rafe inervan el núcleo supraquiasmático. La actividad de estas neuronas depende del estado de vigilia del individuo, ya que disparan de forma regular durante la vigilia, lentamente durante el sueño lento y están silentes durante el sueño REM (Moore, 1999). Se ha sugerido que esta aferencia modularía la sincronización producida por la información lumínica (Albers et al., 1992; Moore, 1999).

El núcleo supraquiasmático recibe, además, aferencias desde corteza cerebral, telencéfalo basal, tálamo, hipotálamo, órganos circunventriculares y tallo cerebral (Moore y Leak, 2001). Estas aferencias transmiten información no-lumínica, principalmente relacionada con el estado en el que se encuentra el organismo.



Las eferencias del núcleo supraquiasmático son de dos tipos:

- Nerviosa: sus principales eferencias nerviosas proyectan al hipotálamo anterior e hipotálamo tuberal, ambos proyectan a órganos efectores. A su vez el hipotálamo anterior inerva, por medio de una vía multisináptica, a la glándula pineal y controla la síntesis de la hormona melatonina. (García Fernández, 1998).

- Hormonal: la hormona melatonina se secreta de manera circadiana al torrente sanguíneo y sincroniza los ritmos de todo el organismo incluido el núcleo supraquiasmático (Rusak y Bina, 1990; Reiter, 1993).

1.5. LA LUZ: EL PRINCIPAL SINCRONIZADOR EXTERNO DEL RITMO CIRCADIANO

Los ritmos circadianos se caracterizan por generarse de forma endógena y por su capacidad de ajustarse a las condiciones ambientales externas caracterizadas principalmente por el

fotoperiodo. El fotoperiodo es el agente sincronizador más potente de los ritmos circadianos (Benstaali et al., 2001). La rotación de la tierra impone un ritmo de aproximadamente 24 horas a las condiciones ambientales. Los organismos sincronizan su actividad a estos cambios ambientales.

En condiciones de oscuridad constantes el periodo de los ritmos se desvía de las 24 horas. En animales nocturnos el periodo de los ritmos circadianos es mayor en condiciones de luz continua que en condiciones de oscuridad continua, mientras que en animales diurnos, entre ellos el hombre, el periodo permanece igual o se acorta en condiciones de luz continua comparado con el periodo en condiciones de oscuridad continua (Benstaali et al., 2001; Meijer, 2001). La regla de Aschoff dice que, en animales nocturnos mantenidos en condiciones continuas, a mayor intensidad de luz mayor periodo en curso libre (Carpenter y Grossberg, 1984).

Cuando los animales se mantienen en oscuridad continua, el sistema circadiano es muy sensible a los pulsos de luz, más que a los pulsos de oscuridad cuando está en condiciones de luz continua. El efecto de un pulso de luz en estas condiciones suele ser un avance o retraso de fase. Esto consiste en un desplazamiento simple de la oscilación sobre el eje temporal, de manera que el ritmo empezará antes o después (respectivamente) de lo que se esperaba según su ritmo en curso libre. La dirección y magnitud del desplazamiento de fase producido por un pulso de luz depende de (Benstaali et al., 2001; Meijer, 2001):

- La intensidad del pulso de luz: para que un pulso de luz produzca un desplazamiento de fase su intensidad debe sobrepasar un umbral, que en el caso de los animales nocturnos es de 0.1 lux. A partir de ese umbral, a mayor intensidad mayor desplazamiento de fase. El umbral en animales nocturnos es mayor, intensidades de aproximadamente 200 lux son suficientes para producir un desplazamiento de fase.
- Duración del pulso de luz: a mayor duración del pulso de luz, mayor desplazamiento de fase.
- Longitud de onda de la luz: El sistema circadiano es más sensible a luz verde y menos a luz roja.
- Fase del ritmo circadiano en la que se produce el pulso de luz: Los pulsos de luz que se presentan al principio de la noche subjetiva producen un retraso de fase, mientras que los que se presentan al final de la noche subjetiva producen un adelanto de fase. Los pulsos de luz presentados durante el día subjetivo no producen desplazamiento de fase. En animales nocturnos la noche subjetiva coincide con el periodo de actividad y en diurnos con el de inactividad. En estos últimos el periodo en que los pulsos de luz no producen desplazamiento de fase no está claro.

Estos efectos de los pulsos de luz sobre la fase del ritmo circadianos se resumen en una *curva de respuesta de fase* (Figura 4). Esta representa la relación entre el momento del ciclo circadiano (día normalizado a 24 horas) en el que se presenta el pulso de luz (eje de abscisas) y la magnitud y dirección del desplazamiento de fase (eje de ordenadas). Los retrasos de fase se representan en valores negativos del eje de ordenadas y los avances de fase en valores positivos de dicho eje:

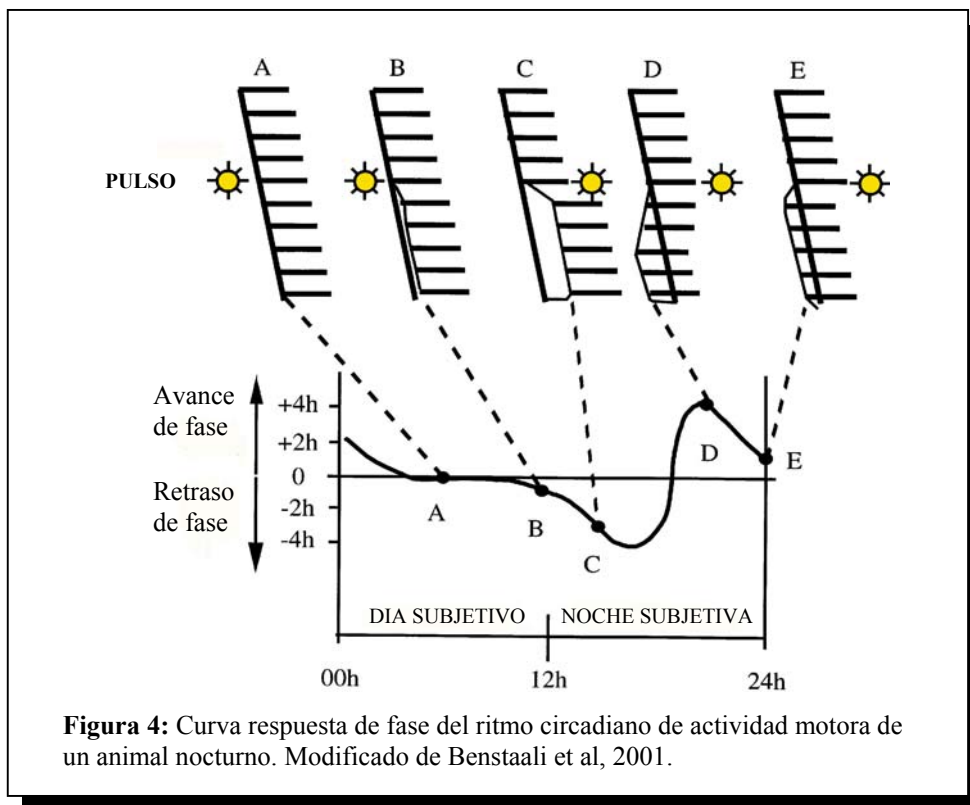


Figura 4: Curva respuesta de fase del ritmo circadiano de actividad motora de un animal nocturno. Modificado de Benstaali et al, 2001.

Esta respuesta dependiente de fase a la luz es la que media la sincronización del periodo en curso libre del reloj endógeno al ciclo externo de oscuridad/luz y a los cambios de fotoperíodo que ocurren a lo largo del año.

La información de la luz se transduce a información nerviosa que se transmite desde las células ganglionares retinianas al núcleo supraquiasmático. En mamíferos los receptores que captan la información de intensidad luminosa se encuentran en la retina. Pero estos fotoreceptores especializados no son conos ni bastones, sino neuronas de la capa ganglionar que contienen un fotopigmento basado en la opsina y la vitamina A, que se denomina melanopsina. Este fotopigmento tiene un pico de sensibilidad cerca de los 480 nm (Cermakian y Sassone-Corsi, 2002; Erren et al., 2003; Foster, 2004). Estas neuronas proyectan al núcleo supraquiasmático a través del tracto retinohipotalámico (figura 5). Si se lesiona este tracto no desaparecen los ritmos en curso libre pero sí la sincronización con el fotoperíodo externo, lo que muestra que la información del fotoperíodo llega al reloj endógeno a través de esta vía nerviosa (Morin, 1994). Los neurotransmisores del tracto retinohipotalámico son los aminoácidos excitadores, aspartato y glutamato, que estimularían las neuronas del núcleo supraquiasmático en presencia de luz (Rusak y Bina, 1990; Morin, 1994). Se ha observado que la concentración extracelular de glutamato en los alrededores del núcleo supraquiasmático presenta una variación circadiana (Honma et al., 1996). Y que la administración de agonistas glutamatérgicos mimetizan la curva fase respuesta producida por los pulsos de luz y la de antagonistas NMDA abole este efecto del glutamato sobre el núcleo supraquiasmático (Ding et al., 1994).

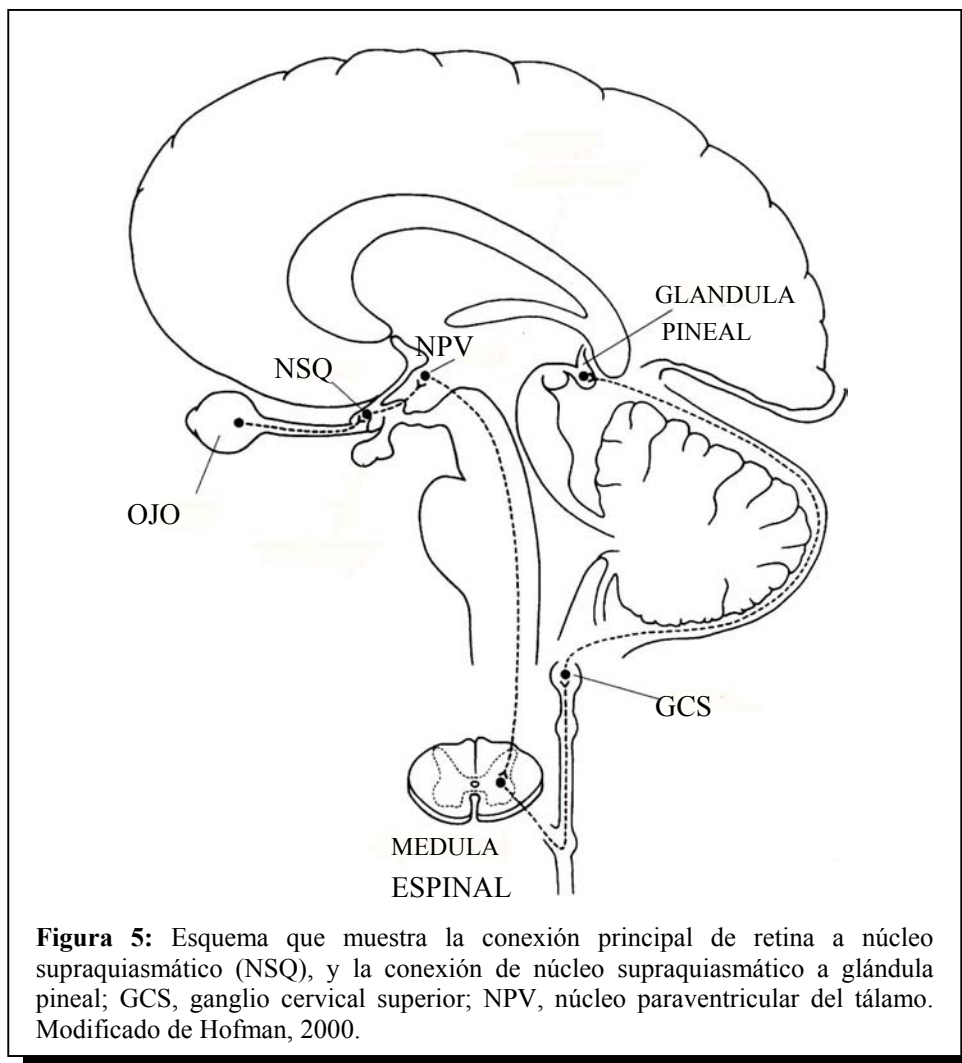


Figura 5: Esquema que muestra la conexión principal de retina a núcleo supraquiasmático (NSQ), y la conexión de núcleo supraquiasmático a glándula pineal; GCS, ganglio cervical superior; NPV, núcleo paraventricular del tálamo. Modificado de Hofman, 2000.

1.6. LA MELATONINA: EL MENSAJERO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

La melatonina es a la vez mensajero hormonal del núcleo supraquiasmático y regulador de la actividad de este núcleo. Esta hormona se sintetiza a partir del triptófano en la glándula pineal. Una vez sintetizada se secreta a sangre, penetrando en diversos fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, ya que al ser una molécula lipofílica atraviesa la barrera hematoencefálica. La síntesis de la melatonina también se produce en otras áreas fuera de la glándula pineal como en retina, glándulas lacrimales o intestino (Ariznavarreta et al., 2002) pero en estas áreas se le ha adjudicado una función paracrina, ya que la pinealectomía produce la casi desaparición de la melatonina circulante.

La síntesis de melatonina en la glándula pineal se produce de manera circadiana, y no se almacena sino que se libera en cuanto la sintetiza (Reiter, 1993), lo que hace que los niveles de melatonina circulantes varíen con un periodo circadiano y sean más altos durante el periodo de oscuridad. Esta producción circadiana de melatonina es el resultado de la llegada de información nerviosa a la glándula pineal desde el núcleo supraquiasmático. Este último núcleo proyecta al núcleo paraventricular, que a su vez proyecta directamente a las neuronas de la columna intermedia de la médula espinal. Estas neuronas preganglionares inervan al

ganglio cervical superior, que inerva la glándula pineal (Moore, 1999). Por la noche las neuronas postganglionares del ganglio cervical superior estimulan la síntesis de melatonina en la glándula pineal. Es condiciones de oscuridad continua los niveles de melatonina circulantes muestran un ritmo circadiano (Reiter, 1993).

El ritmo circadiano de melatonina está influido por la edad, ya que las diferencias día-noche en la concentración de melatonina son de 3 a 5 veces más marcadas en los niños y son menores en ancianos. La estación del año también afecta al ritmo circadiano de melatonina, en verano el comienzo de la secreción de melatonina se adelanta una hora y en invierno se retrasa. Otros factores que afectan al ritmo circadiano de melatonina son el ciclo menstrual, el tiempo diario de exposición al sol, el consumo de algunos fármacos como β -bloqueantes o benzodiacepinas, estrés o el ejercicio (Ariznavarreta et al., 2002).

La presencia de luz actúa de dos maneras sobre la melatonina (Erren et al., 2003): su alternancia periódica sincroniza el ritmo circadiano de melatonina, un pulso suficientemente largo y de suficiente intensidad inhibe la síntesis y liberación de melatonina.

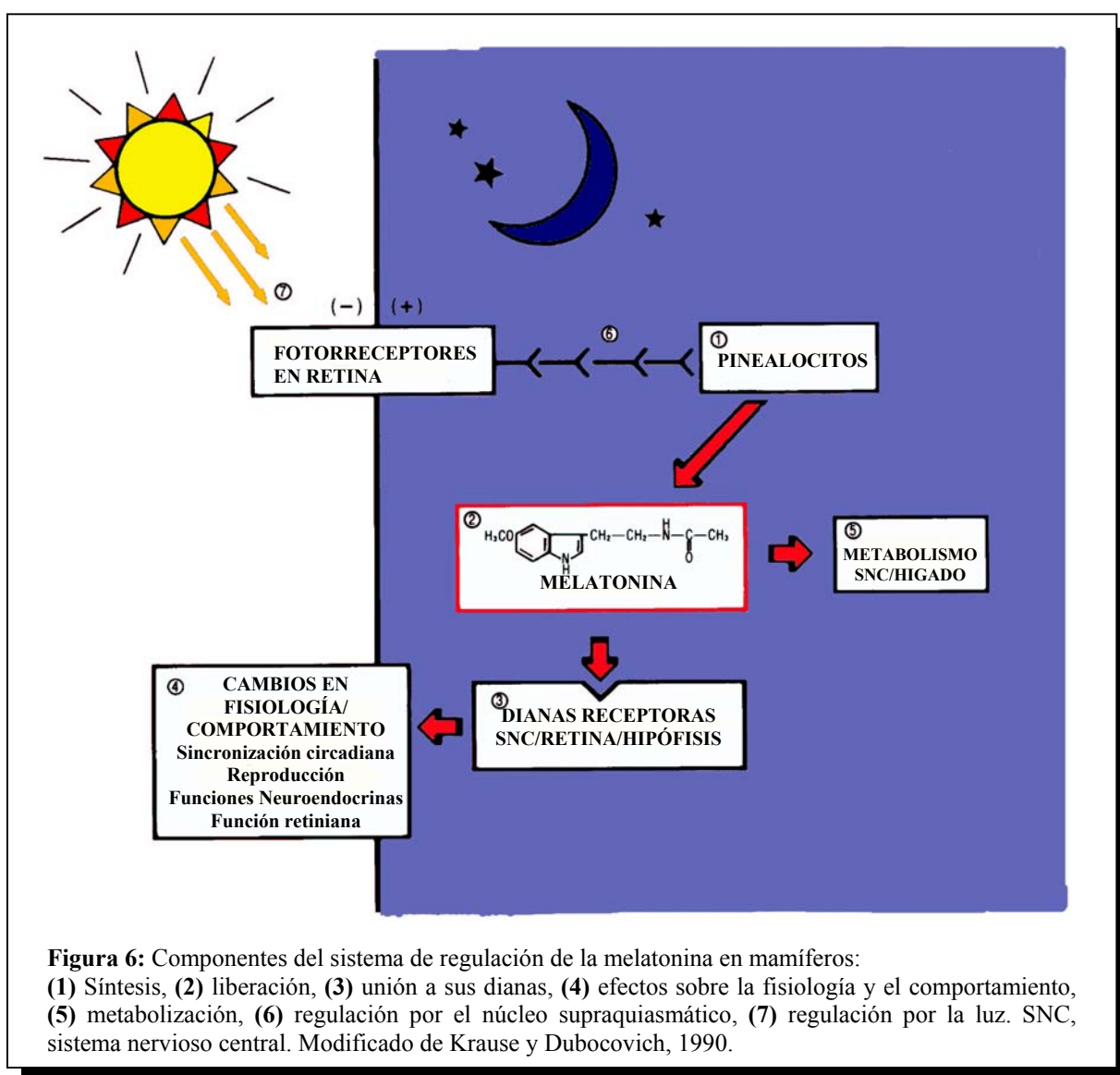


Figura 6: Componentes del sistema de regulación de la melatonina en mamíferos: (1) Síntesis, (2) liberación, (3) unión a sus dianas, (4) efectos sobre la fisiología y el comportamiento, (5) metabolización, (6) regulación por el núcleo supraquiasmático, (7) regulación por la luz. SNC, sistema nervioso central. Modificado de Krause y Dubocovich, 1990.

La vida media de la melatonina es de aproximadamente 10 minutos. En el hígado, la melatonina se metaboliza principalmente por hidroxilación a 6-hidroximelatonina que luego se convierte en sulfato o glucoronida. Su degradación también puede producirse por desacetilación a 5-metoximelatonina que es desaminada a 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol. Esta última es la principal vía de degradación en retina, aunque también se produce en hígado. En cerebro, plexos coroideos y glándula pineal, la melatonina es degradada por la enzima indolamina 2,3- dioxigenasa dando L-Kinurenato (Vanecek, 1998).

Los efectos de la melatonina están ligados a su unión con receptores de membrana de alta afinidad. En mamíferos, se han descrito 3 subtipos de receptores para melatonina: MT₁, MT₂ y MT₃ (Dubocovich et al., 2003).

Los receptores MT₁ y MT₂, también denominados Mel_{1a} y Mel_{1b}, son receptores de membrana acoplados a proteína G y ejercen su acción principalmente mediante la inhibición de la acenil ciclase, lo que conlleva una disminución del AMPc intracelular. Se ha clonado un tercer subtipo, Mel_{1c}, que no se encuentra en mamíferos (Vanecek, 1998; Dubocovich et al., 2003).

El receptor MT₃ no es claro que cumpla todos los criterios de receptor acoplado a proteína G. Su activación estimula la hidrólisis de fosfoinositol (Dubocovich et al., 2003).

La distribución de los receptores de melatonina varía entre especies, sin embargo algunos patrones de distribución se mantienen. En la mayoría de las especies de mamíferos los receptores de melatonina están presentes en la *pars tuberalis* de la hipófisis y en el núcleo supraquiasmático. También se encuentran, en muchas especies, en el área preóptica medial, en el hipotálamo anterior, en los núcleos dorsomedial y ventromedial del hipotálamo, en la *pars distalis* de la hipófisis, en los núcleos paraventricular y anteroventral del tálamo, hipocampo, corteza cerebral y cerebelar, área postrema y retina (Vanecek, 1998). Aunque gran parte de las acciones de la melatonina parecen ligadas a su unión a estos receptores de membrana, la existencia de acciones no dependientes de la presencia de este tipo de receptor sugieren la existencia de receptores citoplasmáticos o nucleares para la melatonina (Pei y Cheung, 2003).

La melatonina ejerce distintas acciones en el organismo:

- Regula los ritmos circadianos endógenos. La administración exógena de melatonina sincroniza los ritmos circadianos que se encuentran en curso libre. Entre ellos el ritmo circadiano de la actividad de las neuronas del núcleo supraquiasmático, ésta sincronización se produce a través de los receptores de alta afinidad para la melatonina existentes en este núcleo. En humanos, la administración de melatonina sincroniza los ritmos de temperatura, sueño/vigilia y el de la melatonina endógena. La curva de respuesta de fase es una imagen especular de la que producen los pulsos de luz. (Cassone et al., 1986; Reiter, 1993; Vanecek, 1998).
- Regula los ritmos circanales. Bajo fotoperiodos naturales, la duración del pico nocturno de melatonina es directamente proporcional a la duración del periodo de luz. El fotoperiodo cambia con las estaciones del año, siendo las noches más cortas en verano y más largas en invierno, y en consecuencia, los picos de melatonina duran menos en verano que en invierno. En animales de reproducción estacional, la melatonina regula el tamaño de los órganos sexuales, la secreción de hormonas

asociadas con la fisiología reproductiva y el ciclo estral (Reiter et al., 1993; Moore, 1999).

- Regula la sensibilidad a la luz en la retina. La melatonina participa en la regulación de las variaciones diarias de fotorreceptores y de la función de epitelio pigmentado, regula la cantidad de luz que llega al receptor controlando el movimiento de los melanosomas en el epitelio pigmentado (Vanecek, 1998).
- Está implicada en la regulación de la función vascular y de la secreción hormonal (Vanecek, 1998).
- Tiene una importante función como agente antioxidante y protector frente a los radicales libres (Poeggeler et al., 1993).

1.9. ENVEJECIMIENTO Y RITMOS CIRCADIANOS

Los relojes circadianos dotan a los organismos de un grado de sincronización interna. Cualquier problema en el sistema circadiano puede influir en un gran número de funciones fisiológicas. El proceso de envejecimiento produce una situación de alteración cronobiológica. Son cambios comunes en la edad avanzada la alteración del ciclo sueño/vigilia en el que se produce fragmentación del sueño, numerosas siestas durante el día, y un adelanto en el despertar y en la inducción de sueño. Existen también una alteración en los ritmos circadianos de secreción de melatonina y otras hormonas, de la temperatura corporal, la actividad motora etc... (Cardinali, 1999). Estos cambios se han observado tanto en humanos como en animales de laboratorio (Monk y Zee, 2001; Turek y Kolker, 2001).

Los principales cambios de los ritmos circadianos con la edad son (Hofman, 2000; Turek et al., 2001; Pandi-Perumal et al., 2002):

- *Cambios en la amplitud.* Se observa una disminución de la amplitud en múltiples ritmos circadianos de funciones fisiológicas y de comportamientos como por ejemplo en el ritmo circadiano de actividad motora, de la temperatura corporal, de la secreción de la hormona de crecimiento o de la prolactina. Esta disminución de la amplitud puede producir una pérdida de la sincronía o una relación de fase inapropiada entre los distintos ritmos circadianos del organismo.

- *Cambios en el periodo de los ritmos en curso libre.* El periodo en curso libre de animales viejos es menor que el de animales jóvenes, se ha sugerido que esto es debido a que el reloj endógeno oscila más rápido en estos animales.

- *Cambios en el ajuste de la fase de actividad al fotoperiodo.* En general los ritmos circadianos en animales viejos muestran un avance de fase en relación a los ritmos circadianos de animales jóvenes.

- *Cambios en la variabilidad día a día del ritmo.* La variabilidad día a día del ritmo se ha relacionado con su amplitud, de manera que a mayor amplitud de un ritmo, menor es la variabilidad que presenta de un día para otro y mayor la precisión del ajuste al fotoperiodo. Con el proceso de envejecimiento se observa una pérdida de esta precisión y un incremento por tanto en la variabilidad, que coincide con la disminución de la amplitud anteriormente comentada.

- *Integridad del ritmo.* Se observa una fragmentación del ritmo tanto en curso libre como sincronizado con el ciclo fotoperiodo.

- *Cambios en la sensibilidad a estímulos sincronizadores lumínicos y no lumínicos.* Existe una disminución de la sensibilidad a estímulos sincronizadores tanto lumínicos como no lumínicos. En animales viejos el umbral de respuesta a pulso de luz más alto, es decir, hace falta un pulso de luz de mayor intensidad para producir un desplazamiento de fase y pulsos de luz de intensidades intermedias producen un desplazamiento de fase es menor en animales viejos.

Muchos de estos cambios se han atribuido al deterioro del funcionamiento de sistema circadianos. Este deterioro puede producirse en los distintos componentes de este sistema:

Los cambios relacionados con el ajuste del ritmo al fotoperiodo deben estar relacionados con cambios en la recepción o transmisión de la información lumínica al núcleo supraquiasmático. En cuanto a la recepción de luz, no hay cambios significativos. La retina no muestra pérdida de número de fotorreceptores o células ganglionares y, aunque se ha descrito una reducción del 10-20% de la luz transmitida por la lente, esta diferencia de sensibilidad a la luz no puede explicar por sí sola los cambios que se producen en los ritmos circadianos con la edad. En cuanto a la transmisión de la información lumínica, el tracto retinohipotalámico no muestra una menor inervación del núcleo supraquiasmático. Sin embargo no han sido descartados cambios en la neurotransmisión de esta vía, ni cambios en la sensibilidad del tejido del núcleo supraquiasmático a la aferencia retinohipotalámica. En relación a estímulos no lumínicos, que también participan en la regulación del ritmo circadiano, se ha descrito una menor respuesta del núcleo supraquiasmático a agonistas serotoninérgicos que sugieren alteraciones en la aferencia desde núcleos de rafe (Monk y Zee, 2001; Turek y Kolker, 2001; Turek et al., 2001).

La melatonina regula la actividad del núcleo supraquiasmático a través de receptores de alta afinidad presentes en esta área del cerebro. Tanto el número de sitios de unión para la melatonina como los niveles nocturnos de esta hormona hacen que la retroalimentación de la melatonina sobre el núcleo supraquiasmático sea de menor intensidad, pudiendo jugar un papel en las alteraciones de los ritmos circadianos observadas durante el proceso de envejecimiento (Turek et al., 2001).

El acortamiento en el periodo, la falta de integridad de los ritmos circadianos y la disminución en la amplitud estarían más relacionados con cambios en el funcionamiento del reloj endógeno. En animales viejos, el núcleo supraquiasmático oscila más rápidamente y con menor amplitud (Hofman, 2000). Aunque en un principio se sugirió una neurodegeneración en este núcleo como causa de la modificación en su funcionamiento (Swaab et al., 1985), estudios posteriores mostraron que el número de células, tanto astrocitos como neuronas, no son diferentes entre animales jóvenes y viejas (Madeira et al., 1995). No se observa pérdida neuronal, ni de neuronas VIP positivas, ni vasopresina positivas. Sin embargo la funcionalidad del núcleo supraquiasmático está alterada ya que existe una disminución de la amplitud del ritmo de tasa media de disparo, una disminución de la utilización de glucosa y de la expresión génica inducida por la luz de sus neuronas (Turek et al., 2001).

Una falta de eficiencia en la salida de la información del reloj endógeno o en la respuesta de los órganos diana pueden participar en los cambios de los ritmos circadianos en el

envejecimiento. De hecho, la melatonina, principal eferencia hormonal del núcleo supraquiasmático, presenta una amplitud de su ritmo circadiano menor en animales viejos (Turek y Kolker, 2001; Turek et al., 2001).

2. CORTEZA PREFRONTAL

2.1. ANATOMÍA

La corteza prefrontal se define como el área de la corteza frontal que conecta recíprocamente con el núcleo mediodorsal-talámico. Esta definición es aplicable al cerebro de todos los mamíferos, pero no está exenta de problemas ya que las proyecciones de este núcleo talámico varían entre especies (Leonard, 1969; Leonard, 1972; Fuster, 1997).

La corteza prefrontal se divide en distintas regiones según las conexiones que recibe de otras áreas (Leonard, 1969; Leonard, 1972; Uylings y Van Eden, 1990):

- La *corteza prefrontal medial* es la porción mayor de la pared medial, anterior y posterior de la rodilla del cuerpo caloso, que a su vez se subdivide en:
 - Corteza precentral
 - Corteza cingulada anterior y ventral anterior
 - Corteza prelímbica e infralímbica
 - Corteza medial orbital
- La *corteza prefrontal orbital*, también denominada lateral o sulcal, forma el labio dorsal del surco rinal. Y se subdivide en:
 - Corteza insular agranular dorsal y ventral
 - Corteza lateral Orbital

2.2. CONEXIONES

A partir de estudios en los que se usan técnicas de autorradiografía, transporte axónico, marcaje por fluorescencia e inmunocitoquímica, se ha podido describir el complejo trazado neuronal de la corteza prefrontal (Uylings y Van Eden, 1990).

.Conexiones entre la corteza prefrontal y el núcleo medio dorsal talámico

La mayor densidad de conexiones de la corteza prefrontal, principalmente de la corteza prefrontal medial, proviene del núcleo mediodorsal talámico (Donoghue y Parham, 1983). Las conexiones recíprocas de este núcleo llegan a la corteza prefrontal como parte de las radiaciones talámicas anteriores y del pedúnculo inferior talámico y se distribuyen mayoritariamente en las capas I y III de esta área cortical de la rata (Uylings y Van Eden, 1990).

En primates, el núcleo mediodorsal talámico se divide en tres partes citoarquitectónicamente bien diferenciadas que conectan con diferentes zonas de la corteza prefrontal: área magnocelular, área parvocelular y área paralamelar (Leonard, 1969; Leonard, 1972; Groenewegen et al., 1990).

La corteza prefrontal también establece conexiones recíprocas con otros núcleos talámicos, como son el núcleo ventral lateral y el núcleo ventral anterior (Donoghue y Parham, 1983; Reep et al., 1990).

.Conexiones entre corteza prefrontal y otras áreas de corteza

Las conexiones entre la corteza prefrontal y otras áreas de corteza presentan una organización topográfica específica y gran parte de ellas son recíprocas. Esta reciprocidad permite distinguir tres secciones (Reep et al., 1990):

- Ventral, une corteza prefrontal e infralímbica con corteza entorrinal y perirrinal
- Rostro-caudal, une al área medial precentral y al área medial precentral con la corteza visual y retrosplenial
- Rostral, une a la corteza cingulada y al área medial precentral con la corteza sensoriomotora y la corteza de asociación somato-sensorial.

.Conexiones entre corteza prefrontal y estriado

La corteza prefrontal conecta con el estriado de manera ordenada y no recíproca (Groenewegen et al., 1990). Estas conexiones se distribuyen en:

- Un eje dorso-ventral: el área cingulada anterior proyecta a la esquina dorsomedial del complejo caudado-putamen, mientras que la parte ventral del área prefrontal envía fibras a la parte medial del estriado ventral.
- Un eje medial-lateral: la corteza prefrontal medial distribuye sus fibras medialmente en el estriado y la corteza prefrontal orbital está conectada con partes más laterales de este complejo.

La corteza prefrontal también conecta con otros núcleos de los ganglios basales: con el núcleo subtalámico de manera no recíproca y con el núcleo pálido ventral de manera recíproca (Groenewegen et al., 1990).

.Conexiones entre corteza prefrontal y áreas límbicas

Diferentes áreas de corteza prefrontal conectan, en mayor o menor medida, con estructuras relacionadas con el sistema límbico (Uylings y Van Eden, 1990):

- El hipocampo, área CA1, envía fibras a la corteza cingulada y a las áreas prefrontal e infralímbicas.
- La amígdala, principalmente desde el núcleo basolateral conecta con la corteza agranular insular y áreas prefrontal e infralímbicas de manera recíproca.
- El hipotálamo, sobre todo el hipotálamo lateral, conecta recíprocamente con la corteza prefrontal.

.Conexiones entre corteza prefrontal y mesencéfalo y puente

La corteza prefrontal recibe aferencias procedentes de área tegmental ventral (A10), núcleo del rafe dorsal (B7), sustancia gris periacueductal, núcleo del tracto solitario, sustancia nigra pars compacta (A9) y formación reticular (Uylings y Van Eden, 1990). En la mayoría de los casos no existe reciprocidad.

2.3. NEUROQUÍMICA DE LA CORTEZA PREFRONTAL

El principal sustrato neuroquímico de la corteza prefrontal está formado por los aminoácidos glutamato y GABA, que se localizan en neuronas piramidales y en interneuronas no piramidales respectivamente. Las neuronas piramidales y las interneuronas están recíprocamente interconectadas entre sí (DeFelipe y Fariñas, 1992; Somogyi et al., 1998) y reciben aferencias de otras áreas cerebrales que liberan dopamina, acetilcolina, glutamato, serotonina y noradrenalina (Mora y Cobo, 1990; Parnavelas, 1990; Descarries et al., 1991; Descarries et al., 1997; Fuster, 1997).

Glutamato

El glutamato intracortical proviene principalmente de las colaterales recurrentes de las neuronas piramidales intrínsecas y de las aferencias talamocorticales y corticocorticales (Fonnum, 1984; Mora y Ferrer, 1986; Peinado y Mora, 1986; Mora y Cobo, 1990; DeFelipe y Fariñas, 1992; Somogyi et al., 1998). La distribución de estos terminales glutamatérgicos es homogénea en todas las capas corticales. Como en el resto del sistema nervioso, el glutamato tiene una acción sináptica excitadora en la corteza prefrontal (Fonnum, 1984; Somogyi et al., 1998)

GABA

El GABA es un neurotransmisor muy abundante en la corteza prefrontal (Parnavelas, 1990), localizado principalmente en las interneuronas no piramidales (Mora y Ferrer, 1986; Somogyi et al., 1998), y en menor medida, de aferencias de otras áreas cerebrales como, por ejemplo del área ventrotectal (Carr y Sesack, 2000). Las interneuronas GABAérgicas se distribuyen de manera homogénea, aunque parecen concentrarse un poco más en la capa IV (Parnavelas, 1990). La inhibición lateral intracortical ejercida por estas interneuronas parece tener un papel fundamental en la organización funcional de la corteza prefrontal (Fuster, 1997; Somogyi et al., 1998; Goldman-Rakic, 1999).

Dopamina

La inervación dopaminérgica de la corteza prefrontal está proporcionada por la vía mesocortical que, desde el área ventrotectal, asciende integrada en el haz prosencefálico medial, distribuyéndose por todas las áreas, fundamentalmente por las corteza infralímbicas y prelímbica (Mora y Ferrer, 1986; Descarries et al., 1987; Kalsbeek et al., 1989; Berger et al., 1991; Tzschentke, 2001). Estas aferencias dopaminérgicas se distribuyen de manera ordenada y sus terminaciones se concentran principalmente en las capas más profundas (V-VI) de la corteza prefrontal (Kalsbeek et al., 1989; Berger et al., 1991).

En general, las terminaciones dopaminérgicas que llegan a corteza prefrontal parecen tener un papel inhibitorio sobre las neuronas corticales (Thierry et al., 1990), aunque actualmente este papel inhibitorio es controvertido (Penit-Soria et al., 1987; Yang et al., 1999) Las proyecciones dopaminérgicas a la corteza prefrontal están implicadas en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje (Decker y Mc Gaunh, 1991).

Acetilcolina

La acetilcolina de la corteza prefrontal tiene su origen en neuronas del telencéfalo basal, que incluyen septum, núcleo de la banda diagonal de Broca y núcleo basal de Meynert (*Sustancia Innominata*). Parte de la acetilcolina existente en la corteza de la rata proviene de neuronas intrínsecas: células no piramidales repartidas entre las capas II y IV (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990; Fuster, 1997). La densidad de inervación parece similar en toda las regiones excepto en la corteza olfativa y entorrinal donde es mayor. En la corteza prefrontal, las terminaciones colinérgicas son especialmente abundantes en las capas profundas corticales (III-IV) (Mora y Ferrer, 1986; Lysakowski et al. 1989; Parnavelas, 1990).

La acción de la acetilcolina en corteza prefrontal es muy compleja y puede ejercer efectos excitatorios e inhibitorios. En general la acetilcolina está relacionada con procesos atencionales y de mantenimiento de la consciencia (Perry et al., 1999; Sarter y Bruno, 1999).

. Consideraciones funcionales

La lesión de la corteza prefrontal produce múltiples síntomas relacionados con la conducta motora, con estrategias de ordenación temporal y espacial de la conducta, con procesos de interacción social y de adaptación al medio de los sujetos (De Bruin, 1990; Kolb, 1990; Le Moal y Simon, 1991; Fuster, 1997; Fuster, 2001).

La actividad de la corteza prefrontal está implicada en procesos cognitivos complejos como la memoria de trabajo, la atención selectiva un tipo de memoria a corto plazo imprescindible para la planificación de la conducta (Goldman-Rackic, 1990; Fuster, 1997; Fuster, 2001), en procesos de atención selectiva, de flexibilidad en el comportamiento, en la regulación del estado de ánimo y en la respuesta a situaciones de estrés que requieren procesos cognitivos complejos (Herman y Culligan, 1997; Fuster, 1997; Fuster, 2001).

3. NEUROTRANSMISORES

3.1. GLUTAMATO

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el sistema nervioso central 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 y que su aplicación iontoforética producía despolarización de neuronas e incremento de la frecuencia de potenciales de acción (Curtis et al., 1959). Actualmente, está bien establecido que el glutamato cumple el papel de neurotransmisor en la mayoría de las sinapsis excitadoras rápidas del sistema nervioso central (Nicholls, 1993).

La transmisión glutamatérgica está asociada al fenómeno de potenciación a largo plazo que es la base molecular de la memoria (Sanchez Andrés, 1998). En enfermos con demencia tipo Alzheimer existe una reducción de los receptores glutamatérgicos en corteza y además existe una hipofunción en la neurotransmisión glutamatérgica cortical e hipocampal (Maragos et al., 1987) posiblemente relacionadas con la pérdida de memoria de estos enfermos.

Por otro lado, un trauma en el sistema nervioso central causa una elevación local del glutamato extracelular de hasta 8 veces sus concentraciones normales. Si este aumento en las concentraciones de glutamato, así como las condiciones patológicas que lo han generado, es mantenido se produce la muerte celular. Esta acción excitotóxica del glutamato se produce por un aumento en el Ca^{2+} intracelular y por síntesis de radicales libres, todo ello desencadenado por la interacción del glutamato con sus múltiples tipos de receptores (Nieto y Verdú, 1998).

3.1.1. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

.Metabolismo del glutamato

El glutamato puede ser sintetizado en el sistema nervioso central a través de multitud de rutas (a partir de glutamina, α -cetoglutarato, proteínas, arginina, ornitina o prolina) siendo sus principales precursores la glucosa y la glutamina (Fonnum, 1993). Actualmente se considera que la síntesis de glutamato en el sistema nervioso central ocurre, principalmente a partir de glutamina por acción de la enzima glutaminasa (Dingledine y McBain, 1994). También existe una ruta de síntesis a partir del α -cetoglutarato catalizada por la aspartato aminotransferasa (Bradford, 1988; Fonnum, 1993) (ver figura 7).

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, 1988); 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) (figura 7).

El catabolismo del glutamato se realiza principalmente por oxidación a través del ciclo de Krebs o por conversión del glutamato en glutamina mediante la enzima glutamina sintetasa (Fonnum, 1993). La glutamina sintetasa se encuentra localizada casi exclusivamente en las células gliales (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979), si bien no se puede excluir una

pequeña actividad de esta enzima en neuronas (Fonnum, 1993). La glutamina glial pasa a la neurona donde vuelve a transformarse en glutamato (figura 7).

El metabolismo del glutamato en el sistema nervioso central se encuentra, por tanto, separado en dos compartimentos celulares: por un lado las terminaciones nerviosas y por el otro las células gliales.

.Almacenamiento, liberación e inactivación

El glutamato sintetizado en la terminación nerviosa es almacenado en vesículas sinápticas. El mecanismo de transporte vesicular de glutamato está acoplado a un gradiente de H^+ generado por una Mg^{2+} -ATPasa dirigida hacia el interior de la vesícula (Nicholls, 1993). También existe un almacén de glutamato en el citoplasma. La liberación sináptica se produce por exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Bradford, 1988) (figura 7).

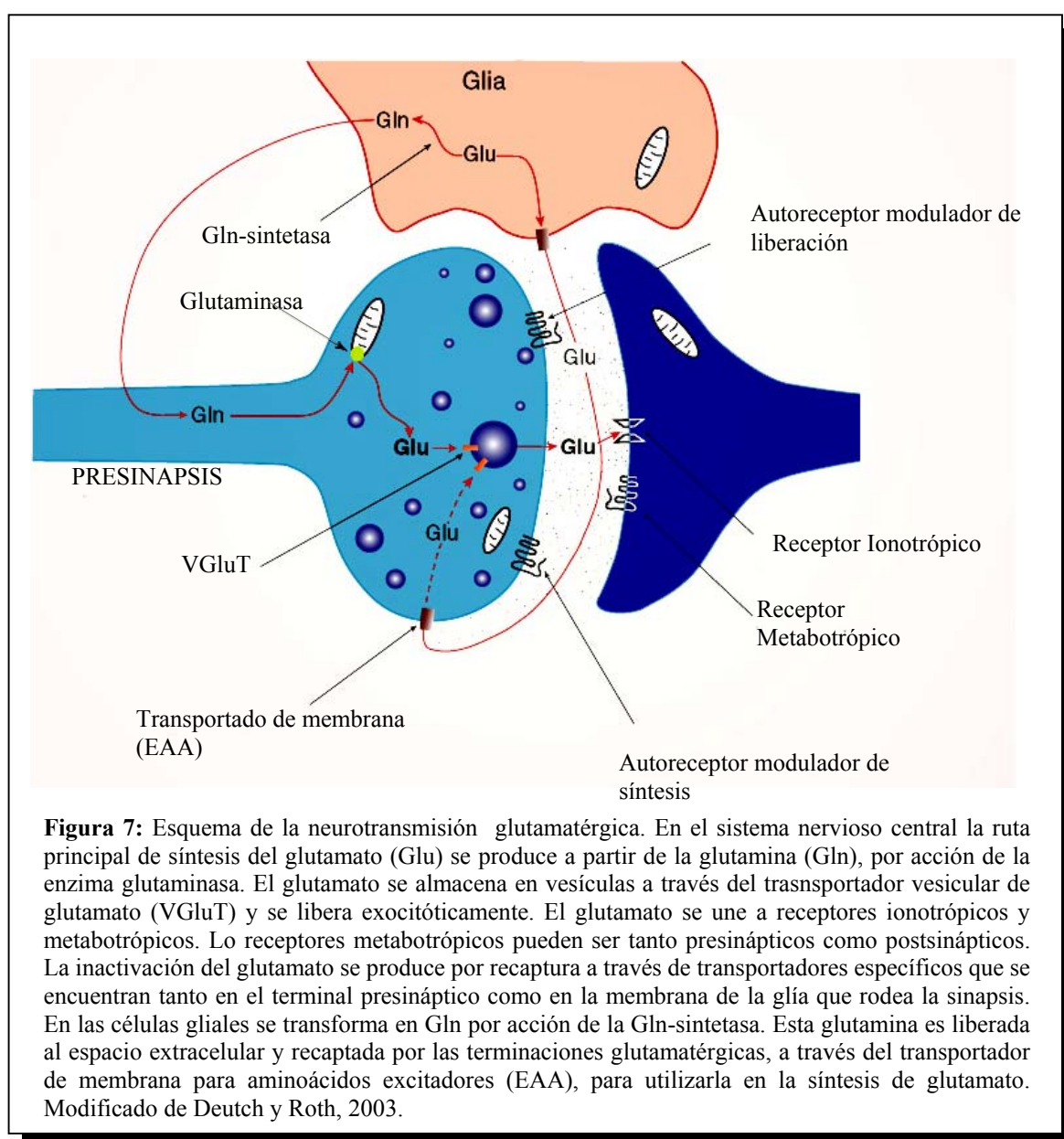


Figura 7: Esquema de la neurotransmisión glutamatergica. En el sistema nervioso central la ruta principal de síntesis del glutamato (Glu) se produce a partir de la glutamina (Gln), por acción de la enzima glutaminasa. El glutamato se almacena en vesículas a través del transportador vesicular de glutamato (VGluT) y se libera excitóticamente. El glutamato se une a receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores metabotrópicos pueden ser tanto presinápticos como postsinápticos. La inactivación del glutamato se produce por recaptura a través de transportadores específicos que se encuentran tanto en el terminal presináptico como en la membrana de la glía que rodea la sinapsis. En las células gliales se transforma en Gln por acción de la Gln-sintetasa. Esta glutamina es liberada al espacio extracelular y recaptada por las terminaciones glutamatergicas, a través del transportador de membrana para aminoácidos excitadores (EAA), para utilizarla en la síntesis de glutamato. Modificado de Deutch y Roth, 2003.

La inactivación del glutamato 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 de gradientes de Na^+ y K^+ (Pocock et al., 1993). De estos dos componentes celulares, el glial es el que capta la mayoría del glutamato liberado (Dingledine y McBain, 1994) (figura 7).

El transporte de glutamato puede invertirse cuando la concentración extracelular de K^+ es elevada o cuando se disipa el gradiente de Na^+ (por ejemplo con vestradina), produciéndose una liberación de glutamato que es independiente de Ca^{2+} . Este tipo de liberación se ha demostrado *in vitro* (Nicholls, 1989; Attwell et al., 1993). También se ha visto, *in vivo*, que el glutamato puede ser liberado vía transportador (Del Arco et al., 1999).

.Receptores

Los estudios farmacológicos y moleculares han permitido demostrar la existencia en el sistema nervioso de receptores glutamatérgicos de dos clases: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Los ionotrópicos se clasifican según sus agonistas específicos en N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) y Kainato (KA); y los metabotrópicos se dividen en 8 tipos (mGluR₁₋₈) (Ver tablas 3 y 4).

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 (Dingledine y McBain, 1994; MacDonald et al., 1996).

	RESPUESTA CELULAR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	LOCALIZACIÓN
NMDA	↑ permeabilidad Ca^{2+} , Na^+ , K^+	NMDA, glicina	D-AP5, CGS19755	Hipocampo, estriado tálamo, corteza y cerebelo (capa granular)
AMPA	↑ permeabilidad Na^+ , K^+	AMPA	NBQX, GYKI52466	Similar al NMDA: Cerebelo (capa molecular)
KA	↑ permeabilidad Na^+ , K^+	Kainato, Domoato	Kinurenato, AMOA	Complementario a los NMDA/AMPA: hipocampo, hipotálamo, corteza, médula espinal

Tabla 1: Características y distribución de los receptores de ionotrópicos (Dingledine y McBain, 1994; MacDonald et al., 1996; Cooper et al., 1996)

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 glutamato) 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 glutamato en el espacio extracelular (Dingledine y McBain, 1994).

Se considera que el receptor AMPA es el responsable de la transmisión excitadora rápida mediada por glutamato 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 (Cooper et al., 1996).

El papel fisiológico de los receptores KA está poco definido. 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 (Cooper et al., 1996).

La activación de receptores glutamatérgicos metabotrópicos puede inhibir la transmisión glutamatérgica. Este efecto está mediado, probablemente, por autorreceptores presinápticos del tipo mGluR₄, mGluR₂ y mGluR₃ (MacDonald et al., 1996).

En general, se ha asignado a los receptores metabotrópicos un papel predominantemente modulador de la neurotransmisión. La activación de estos receptores puede producir, en función de los distintos efectores a los que estén acoplados, efectos tanto excitadores como inhibidores (MacDonald et al., 1996).

Estudios recientes describen una posible función metabotrópica de los receptores KA, presentes en presinapsis de interneuronas GABAérgicas hipocampales, sobre la liberación de GABA. Esta regulación se produciría a través de una cadena proteína G – fosfolipasa C – diacilglicerol –proteín quinasa C. No se conoce todavía el mecanismo de acoplamiento entre el receptor KA y la proteína G (Rodríguez-Moreno et al., 2000). El receptor KA no sería sólo un receptor ionotrópico sino que tendríamos que hablar de él como receptor ionometabotrópico.

	RESPUESTA CELULAR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	LOCALIZACIÓN
MGluR 1-8	↑ IP3/DG ↓ AMPc	1S,3R-ACPD L-AP4	L-AP3	hipocampo, corteza, cerebelo (capa molecular), bulbo olfatorio, sustancia negra

Tabla 2: Características y distribución de los receptores de metabotrópicos (Dingledine y McBain, 1994; MacDonald et al., 1996; Cooper et al., 1996)

. Vías glutamatérgicas

Las neuronas glutamatérgicas están distribuidas ampliamente en todo el sistema nervioso central, principalmente en el telencéfalo, donde la mayoría de las proyecciones corticales contienen glutamato (Cotman et al., 1987). Las vías glutamatérgicas son funcionalmente heterogéneas, debido a la diferente distribución de los receptores glutamatérgicos. 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 glutamatérgicas mejor conocidas son (Cotman et al., 1987):

- Las proyecciones cortico-fugales que, desde corteza, llegan a estriado, tálamo y núcleos del tronco cerebral.
- Vías tálamo-corticales
- Cortico-corticales

Son glutamatérgicas, por ejemplo, la vía perforante, las fibras comisurales, las fibras musgosas y las colaterales de Schaffer (Fagg y Foster, 1983; Fonnum, 1984; Peinado y Mora, 1986; Cotman et al., 1987). La vía retino-hipotalámica, que proyecta desde la retina al núcleo supraquiasmático, también es de naturaleza glutamatérgica (Honma et al., 1996).

3.1.2. ÁCIDO GLUTÁMICO Y RITMOS CIRCADIANOS

Existen evidencias de que el glutamato junto con el aspartato pueden ser los neurotransmisores de numerosas fibras del sistema reticular ascendente de activación, y estarían implicados en la generación de la fase de vigilia dentro del ciclo sueño-vigilia (Andres et al., 1998).

La mayoría de los estudios de glutamato desde la perspectiva de los ritmos circadianos se centran en su papel en relación con el núcleo supraquiasmático:

Las señales luminosas se transmiten desde retina al núcleo supraquiasmático a través del tracto retinohipotalámico. Los neurotransmisores de dichas vías son los aminoácidos excitadores, aspartato y glutamato, que estimularían las neuronas del núcleo supraquiasmático en presencia de luz (Rusak y Bina, 1990). Se ha observado que la concentración extracelular de glutamato en los alrededores del núcleo supraquiasmático presenta una variación circadiana (Honma et al., 1996). Y que la administración de agonistas glutamatérgicos mimetizan la curva fase respuesta producida por los pulsos de luz y la de antagonistas NMDA abole este efecto del glutamato sobre el núcleo supraquiasmático (Ding et al., 1994).

Teniendo en cuenta la amplia distribución del glutamato en sistema nervioso central, es posible que existan variaciones circadianas de sus concentraciones extracelulares en otras estructuras cerebrales.

3.2. GABA

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de los mamíferos y uno de los más estudiados desde que, en la década de los 50 fue descubierto en el tejido nervioso (Roberts y Frankel, 1950; Awapara et al., 1950). Una década después se identificó como neurotransmisor fundamental del sistema nervioso central (Krnjevic y Schwartz, 1966; Obata y Takeda, 1969), siendo mediador de sinapsis químicas de tipo inhibitorio. Es el neurotransmisor más abundante del sistema nervioso central en mamíferos, estando sin embargo ausente en tejidos periféricos (Cooper et al., 1996).

Su función principal sería modular los sistemas excitadores. Además existen evidencias de su papel en la modulación de procesos relacionados con el estado consciente, la ansiedad, la

termorregulación, el aprendizaje, el control motor, la respuesta hormonal y el control de la ingesta. En los últimos años se ha relacionado la disfunción de los sistemas GABAérgicos con ciertos desórdenes neurológicos y psiquiátricos tales como el corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson, las epilepsias, la discinesia tardía, el alcoholismo o la esquizofrenia (DeLorey y Olsen, 1994).

2.3.1. NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA

.Metabolismo del GABA

En el cerebro del mamífero adulto, el glutamato es el principal precursor del GABA, a través del ciclo de la glutamina. La enzima citoplasmática ácido glutámico descarboxilasa (GAD) cataliza la α -decarboxilación de glutamato, dando lugar a GABA y CO_2 , usa como cofactor el piridoxal fosfato. Esta reacción es irreversible y está estrechamente regulada (Bradford, 1988). Existen otras vías de síntesis de GABA en el cerebro pero esta es la principal (ver figura 8).

La forma activa de la GAD se produce por su unión al cofactor piridoxal fosfato, esta unión está controlada por ATP y fosfato inorgánico. El 50% de la GAD está en forma de apoenzima inactiva a pesar de que la concentración de piridoxal fosfato en cerebro es suficiente para saturar completamente a la enzima (Davies, 1996). La enzima se inhibe por Zn^{2+} , por cetoglutarato y por producto final (Martin y Rinvall, 1993).

Cortocircuito del GABA: se trata de un ciclo cerrado, íntimamente ligado al metabolismo de los carbohidratos. El α -oxoglutarato, uno de los metabolitos del ciclo de Krebs, es sustrato junto con el GABA de la enzima GABA transaminasa que lo transforma en glutamato, el cual se convierte en GABA por acción de la GAD. El GABA a su vez es sustrato de esta enzima, dando lugar a semialdehído succínico que se incorpora de nuevo al ciclo de Krebs. Esta reacción ocurre cuando una molécula de α -oxoglutarato está presente para aceptar el grupo amino que se libera del GABA. A través de esta vía se reutilizan los esqueletos carbonados del GABA. Diversos estudios sugieren que entre 10%-40% del metabolismo cerebral podría derivarse a través de este cortocircuito (DeLorey y Olsen, 1994). Esta vía está presente tanto en terminales nerviosos como en las células gliales, que recaptan el GABA liberado a la hendidura sináptica (figura 8).

.Almacenamiento, liberación e inactivación

El GABA sintetizado en el citoplasma es acumulado en vesículas mediante un sistema de transporte vesicular de baja afinidad para GABA. Este transporte es dependiente de Na^+ y está acoplado a un gradiente electroquímico de H^+ , generado por una ATPasa dependiente de Mg^{2+} , y se satura por la concentración de GABA (Bradford, 1988) (figura 4).

La liberación del neurotransmisor se produce por exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Bradford, 1988). Se ha sugerido que existe otro tipo de liberación no vesicular, no secundaria a impulso depolarizante y no dependiente de Ca^{2+} a través de transportador (Levi y Raiteri, 1993).

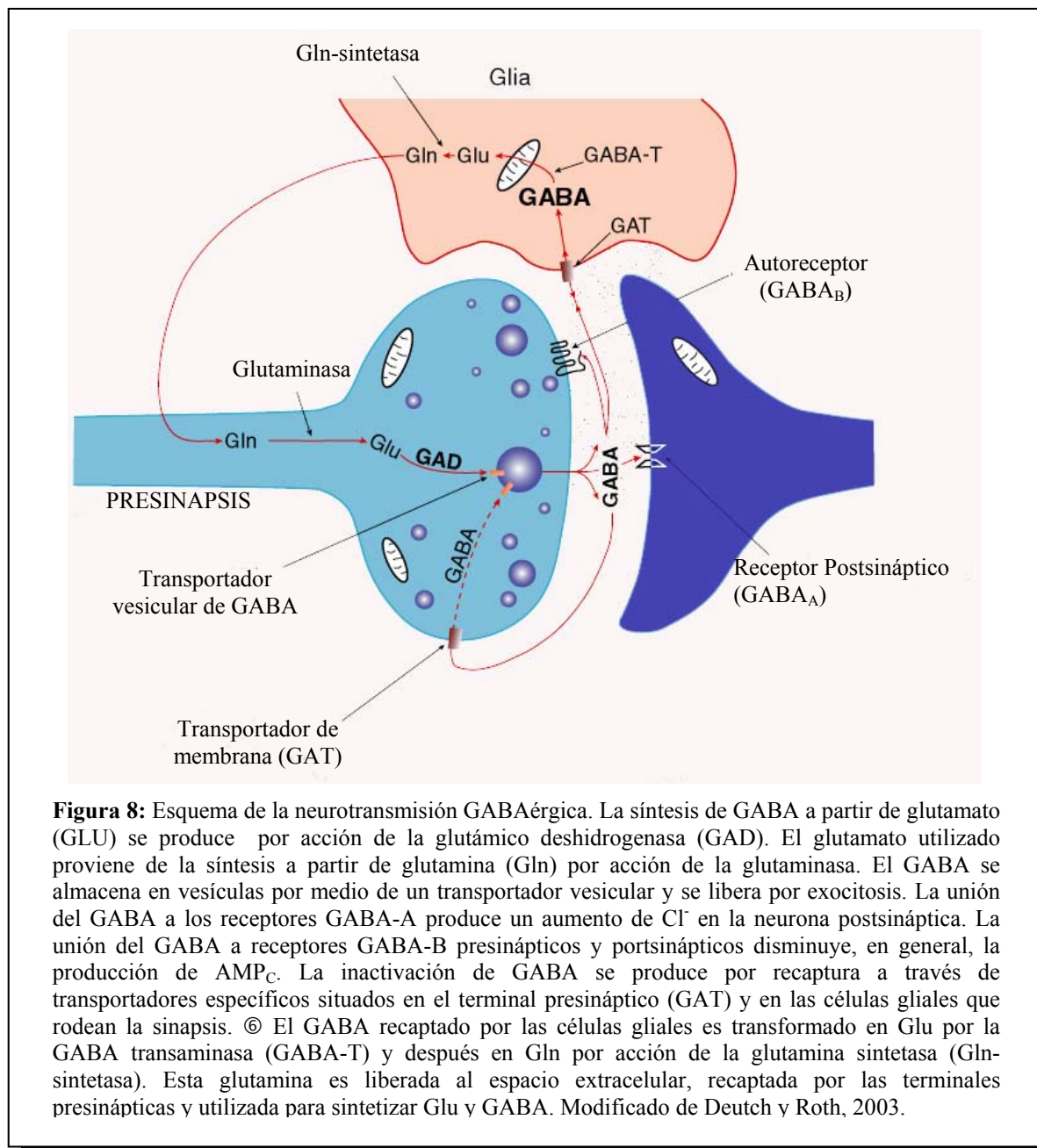


Figura 8: Esquema de la neurotransmisión GABAérgica. La síntesis de GABA a partir de glutamato (GLU) se produce por acción de la glutámico deshidrogenasa (GAD). El glutamato utilizado proviene de la síntesis a partir de glutamina (Gln) por acción de la glutaminasa. El GABA se almacena en vesículas por medio de un transportador vesicular y se libera por exocitosis. La unión del GABA a los receptores GABA-A produce un aumento de Cl^- en la neurona postsináptica. La unión del GABA a receptores GABA-B presinápticos y postsinápticos disminuye, en general, la producción de AMP_c . La inactivación de GABA se produce por recaptura a través de transportadores específicos situados en el terminal presináptico (GAT) y en las células gliales que rodean la sinapsis. © El GABA recaptado por las células gliales es transformado en Glu por la GABA transaminasa (GABA-T) y después en Gln por acción de la glutamina sintetasa (Gln-sintetasa). Esta glutamina es liberada al espacio extracelular, recaptada por las terminales presinápticas y utilizada para sintetizar Glu y GABA. Modificado de Deutch y Roth, 2003.

El GABA liberado en la hendidura sináptica es recaptado por la terminal nerviosa, donde puede ser almacenado de nuevo, o por la glía circundante, donde es metabolizado a semialdehído succínico por la GABA-transaminasa, regenerando así un glutamato. Este glutamato se transforma en glutamina gracias a la acción de la glutamina sintetasa. La glutamina es transferida a la neurona GABAérgica donde reingresa en el ciclo de GABA (Bradford, 1988). La recaptura del GABA se produce a través de un sistema de transporte activo de alta afinidad para el GABA. Es un transportador dependiente de Na^+ , Cl^- y temperatura, y saturable por su sustrato (Cooper et al., 1996).

.Receptores

Los receptores GABAérgicos son receptores que actúan modificando la permeabilidad de la membrana a ciertos iones.

En general, se aceptan 3 tipos de receptores GABA (ver tabla 3): GABA-A, GABA-B y GABA-C. Los dos primeros median aumentos en la conductancia del ión Cl⁻ provocando una hiperpolarización de la membrana, mientras que los GABA-B están acoplados a proteínas G e interaccionan con canales K⁺ o Ca²⁺ (Cooper et al., 1996).

Los receptores GABA-A son sensibles a sustancias que modulan su actividad, como las benzodiazepinas y los barbitúricos. Estas sustancias son importantes porque son potentes anticonvulsivos y/o ansiolíticos (Bormann y Feigenspan, 1995; Cooper et al., 1996). Se localizan postsinápticamente.

Los receptores GABA-B se localizan tanto pre como postsinápticamente, actuando, en la presinapsis, como autorreceptores (Lerma et al., 1998).

Los receptores GABA-C se localizan principalmente en retina y median la inhibición lateral a las respuestas lumínicas (Bormann y Feigenspan, 1995; Cooper et al., 1996).

	RESPUESTA CELULAR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	MODULADOR	LOCALIZACIÓN
GABA-A	↑Cl ⁻	Muscimol	Bicuculina, Picrotoxina	benzodiazepinas, barbitúricos, etanolesteroides, cationes	Ampliamente distribuido
GABA-B	pre : ↓ Ca ²⁺ vía AC post: ↑ K ⁺ vía IP ₃	Baclofén	Faclofen	-----	Ampliamente distribuido.
GABA-C	↑Cl ⁻	CACA	Picrotoxina	-----	Retina, hipocampo y corteza

Tabla 3: Características y distribución de los receptores de GABA, abrev: AC, adenilciclase; IP3, fosfatidil inositol; CACA, ácido cis-4-aminocrotónico; pre, presináptico; pos, postsináptico (Cooper et al., 1996).

.Vías GABAérgicas

El GABA está ubicuamente distribuido, a diferencia de otros sistemas que se organizan en poblaciones relativamente limitadas de neuronas (Cooper et al., 1996). Algunas regiones cerebrales tienen una mayor abundancia de neuronas GABAérgicas respecto a otra, por ejemplo el cuerpo estriado, el *globus pallidus*, la sustancia negra *pars reticulata*, varios núcleos de la amígdala y el núcleo interpeduncular (Mugnaini y Oertel, 1985).

Las neuronas GABAérgicas pueden ser interneuronas, integradas dentro de circuitos locales inhibidores. Predominantemente en (Mugnaini y Oertel, 1985): Corteza cerebral, Hipocampo, Bulbo olfatorio, Hipotálamo, Retina, estriado, sustancia negra, tálamo, colículos superior e inferior, cerebelo y médula espinal (Fagg y Foster, 1983).

Las neuronas de proyección GABAérgicas mejor definidas se encuentran en:

- Cerebelo: neuronas de Purkinje corticofugales
- En los ganglios basales:
 - Vía estriatonigral
 - Vía estriatopalidal
- Corteza cerebral e hipocampo

Los ganglios basales son sin duda la región cerebral que presenta mayor abundancia de proyecciones GABAérgicas, formando circuitos complejos donde los procesos de inhibición y desinhibición tienen un papel fundamental (Fagg y Foster, 1983; Mugnaini y Oertel, 1985; McGeer y McGeer, 1989).

3.2.2 GABA Y RITMOS CIRCADIANOS

En relación con el ciclo sueño-vigilia, las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular del tálamo son las encargadas de inhibir la actividad del sistema reticular ascendente de activación que proyecta a tálamo y corteza. Esta inhibición da lugar a la aparición del sueño lento (Andres et al., 1998).

El GABA es el principal neurotransmisor de las neuronas del núcleo supraquiasmático, encontrándose en la mayoría de los somas y terminales de las neuronas de este núcleo (Wagner et al., 1997). GABA y sus agonistas pueden sincronizar el reloj circadiano y los antagonistas bloquean el ajuste del reloj que producen determinadas drogas y la luz (Wagner et al., 1997).

Recientemente se ha mostrado que el GABA tiene un efecto dual en el núcleo supraquiasmático: actúa como neurotransmisor inhibitorio durante la noche, y como neurotransmisor excitador durante el día. Este efecto dual está mediado por receptores GABA-A y podría estar atribuido a una oscilación de la concentración de Cl⁻ intracelular. Altas concentraciones del Cl⁻ intracelular durante el día producirían respuestas excitadoras al GABA, mientras que bajas concentraciones de Cl⁻ intracelular durante la noche resultarían en una respuesta inhibitoria (Wagner et al., 1997).

Además se han descrito variaciones circadianas en la densidad de receptores de GABA en la corteza prefrontal del hámster (Kanterewicz et al., 1995). Existe la posibilidad de que haya una regulación circadiana de las concentraciones extracelulares de GABA en algún área del sistema nervioso central.

3.3 DOPAMINA

La dopamina es uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso central. Hasta mediados de la década de los años 50, la dopamina fue considerada tan sólo un intermediario del metabolismo de la adrenalina y de la noradrenalina. Posteriormente se comprobó que, tanto en el sistema nervioso central como en la periferia, la concentración y la localización de la dopamina eran diferentes a las de la noradrenalina y además la dopamina cumplía los requisitos necesarios para ser considerada un neurotransmisor. Bioquímicamente

pertenece al grupo de las catecolaminas junto a la noradrenalina y la adrenalina (Weiner y Molinoff, 1994).

La dopamina está implicada en la regulación de muchas funciones fisiológicas: regula la liberación de las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario, sobre todo de la prolactina y hormona liberadora de tiotropina, y forma parte del llamado "circuito de recompensa" que codifica las sensaciones placenteras asociadas a estímulos sensoriales (Mora et al., 1977; Weiner y Molinoff, 1994). Además, estudios de autoadministración han demostrado que la dopamina del área tegmental ventral está fuertemente relacionada con el mecanismo de adicción a drogas de abuso (Mora, 1996).

El descubrimiento de que en la enfermedad de Parkinson hay una severa pérdida del contenido de dopamina en el cuerpo estriado confirmó su importancia en sistema nervioso central (Cooper et al., 1996). Junto con la serotonina, la dopamina se relaciona con procesos psiquiátricos, en particular con la esquizofrenia y con los trastornos afectivos (Baskys y Remington, 1996).

3.3.1. NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA

.Metabolismo de la dopamina

El precursor de la dopamina es el aminoácido esencial tirosina que atraviesa la barrera hematoencefálica a través de un transportador activo que comparte con otros aminoácidos neutros (Baskys y Remington, 1996).

Una vez en la neurona catecolaminérgica se transforma en 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) por acción de la tirosina hidroxilasa, que añade un grupo hidroxilo a la tirosina. Esta enzima requiere como cofactores tetrabiopterina y oxígeno molecular y se satura por su sustrato. La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas y es inhibida por su producto (Weiner y Molinoff, 1994).

La transformación de L-DOPA en dopamina es catalizada por la enzima DOPA descarboxilasa o descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Esta reacción es muy rápida por lo que la concentración de L-DOPA en el interior de la célula es mínima. El cofactor de esta enzima es el piridoxal fosfato. Es posible aumentar la concentración de dopamina en este paso, aumentando el sustrato, L- DOPA (Weiner y Molinoff, 1994).

La degradación de la dopamina se realiza a través de dos sistemas enzimáticos (Weiner y Molinoff, 1994) (ver figura 9):

1. Monoamino oxidasa (MAO): está localizada en la membrana externa de la mitocondria. Esta enzima cataliza la desaminación de las monoaminas, no es específica de la dopamina. Sólo degrada las moléculas libres en el citosol. El metabolito principal derivado de la acción de la MAO es el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC).

2. Catecol-O-metil transferasa (COMT): En el sistema nervioso central se encuentra en la hendidura sináptica o en sitios extraneuronales. La dopamina liberada es convertida por la acción secuencial de esta enzima y la MAO en ácido homovalínico (HVA).

El DOPAC y el HVA son los principales productos de degradación de la dopamina. En el sistema nervioso central de la rata el DOPAC es el metabolito más abundante, mientras que en el del ser humano lo es el HVA. Ambos se encuentran en forma libre y como sulfoconjugados. Mientras que el primero se considera más en relación con el metabolismo de la dopamina aún no liberada (metabolito intracelular), la concentración de HVA se considera un buen reflejo de la actividad dopaminérgica (Cooper et al., 1996).

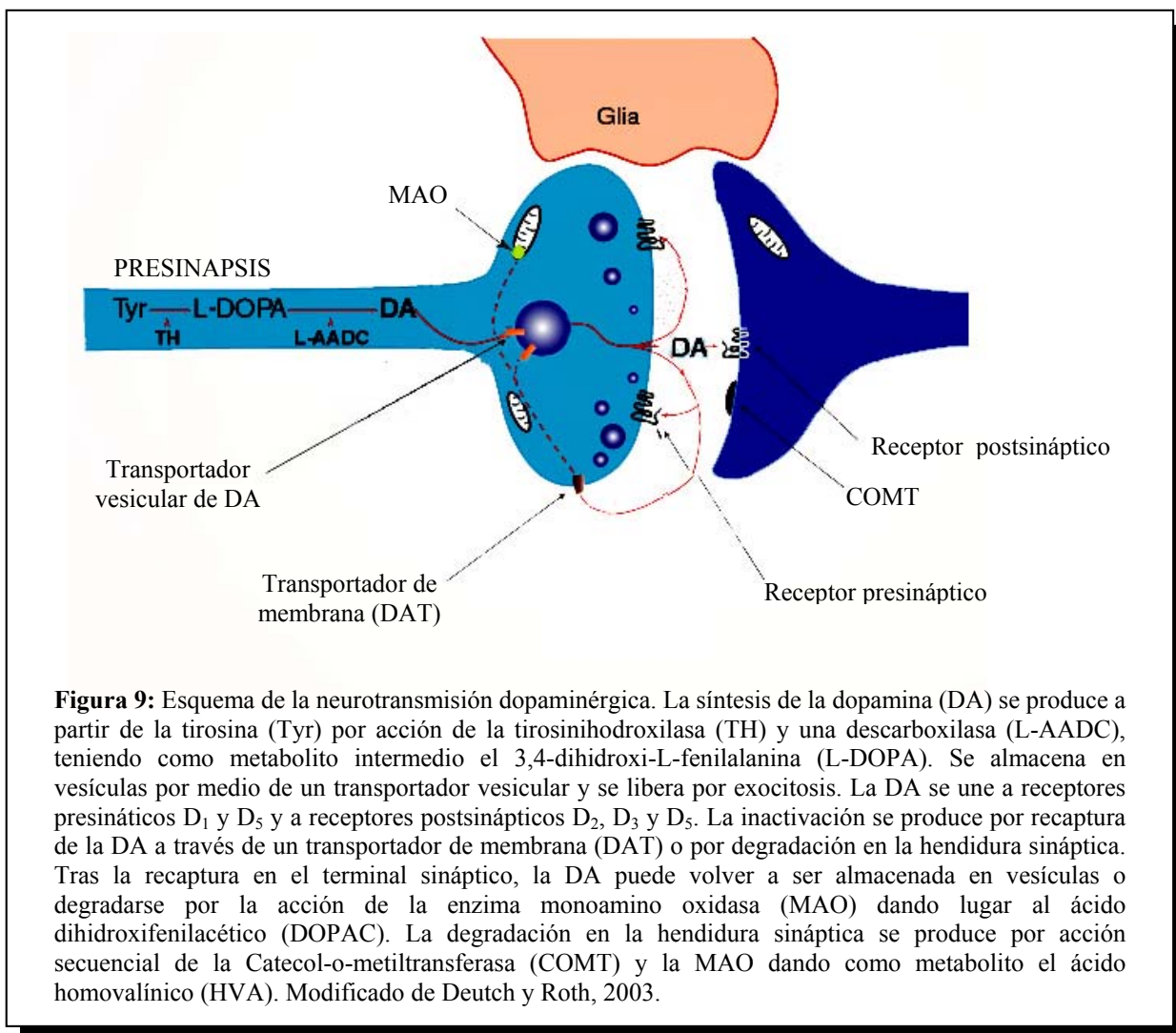


Figura 9: Esquema de la neurotransmisión dopaminérgica. La síntesis de la dopamina (DA) se produce a partir de la tirosina (Tyr) por acción de la tirosinohidroxilasa (TH) y una descarboxilasa (L-AADC), teniendo como metabolito intermedio el 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). Se almacena en vesículas por medio de un transportador vesicular y se libera por exocitosis. La DA se une a receptores presinápticos D₁ y D₅ y a receptores postsinápticos D₂, D₃ y D₅. La inactivación se produce por recaptura de la DA a través de un transportador de membrana (DAT) o por degradación en la hendidura sináptica. Tras la recaptura en el terminal sináptico, la DA puede volver a ser almacenada en vesículas o degradarse por la acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO) dando lugar al ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). La degradación en la hendidura sináptica se produce por acción secuencial de la Catecol-o-metiltransferasa (COMT) y la MAO dando como metabolito el ácido homovalínico (HVA). Modificado de Deutch y Roth, 2003.

La dopamina se almacena en vesículas en el terminal sináptico, pasa al interior de la vesícula a través de un transportador dependiente de ATP acoplado a una bomba de protones. Este transportador es inhibido por reserpina. En el interior de la vesícula, la dopamina se asocia a ATP dando lugar a gránulos densos llamados cromograninas (Weiner y Molinoff, 1994) (ver figura 9).

La liberación de la dopamina es dependiente de Ca^{2+} (Cooper et al., 1996). El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la fusión de las vesículas con la membrana plasmática de la terminal y el neurotransmisor es liberado por exocitosis junto con ATP a la hendidura sináptica. La dopamina que se encuentra en el citoplasma puede ser liberada de forma independiente de Ca^{2+} mediante la reversión del transporte de dopamina a través de los

sistemas transportadores que se encuentran en la terminación nerviosa, aunque esta liberación independiente de Ca^{2+} no parece ser fisiológica y se ha estudiado en relación con drogas de adicción como por ejemplo la anfetamina (Levi y Raiteri, 1993; Seiden et al., 1993; Del Arco et al., 1999).

La inactivación del neurotransmisor dopamina se realiza por dos procesos:

- La recaptura por transportadores que introducen la dopamina liberada en los terminales dopaminérgicos finalizando así su acción sobre los receptores. El transportador específico de dopamina pertenece a la superfamilia de los transportadores dependientes de Na^+ y Cl^- . Utiliza la energía suministrada por el gradiente de Na^+ que genera una ATPasa acoplada a una bomba Na^+/K^+ para la recaptura del sustrato (Cooper et al., 1996). El transportador de dopamina se encuentra tanto en terminales, como en el pericarion, en las dendritas o a lo largo de los axones (Kuhar et al., 1998). Tras la recaptura, la dopamina puede ser almacenada de nuevo en vesículas o degradada dando como metabolito principal DOPAC.

- La degradación de la dopamina en la hendidura sináptica mediante la COMT seguida de la MAO dando HVA (Cooper et al., 1996).

.Receptores

Farmacológica y molecularmente, pertenecen a la superfamilia de receptores asociados a proteínas G. Se han descrito hasta cinco tipos de receptores dopaminérgicos agrupados en dos familias, D1 y D2 (ver tabla 4).

		RESPUESTA CELULAR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	LOCALIZACIÓN
D1	D1	↑ AMPc	SFK-38393	SH-23090	Estriado, accumbens tubérculo olfatorio y amígdala
	D5	↑ AMPc	-----	-----	Hipocampo, hipotálamo
D2	D2	↓ AMPc	Quimiprirol Bromocriptina	Raclopride Sulpiride Domperidona	Estriado, accumbens, sustancia negra, área tegmental ventral
	D3	↓ AMPc	PDI-28907	Neurolépticos atípicos, Nafadotride	Sistema límbico y núcleo accumbens
	D4	↓ AMPc	-----	Clozapina	Hipocampo, tálamo, corteza frontal y médula espinal

Tabla 4: Características generales y distribución de los receptores de dopamina (Baskys y Remington, 1996).

Los receptores tipo D1 comprende los receptores tipo D1 y D5. Los receptores D5 se localizan presinápticamente, son mucho menos abundantes que los D1 y no existen drogas selectivas para ellos. Ambos receptores estimulan la actividad enzimática de la adenil ciclasa (Baskys y Remington, 1996).

Los receptores tipo D2 (D2, D3, D4) inhiben la acción de la adenil ciclasa. Los receptores D2 están localizados presinápticamente. Los receptores presinápticos (D2 y D5) actúan como autorreceptores en la terminal dopaminérgica o bien en dendritas. Su función es regular la liberación del neurotransmisor en la dendrita, descendiendo la tasa de disparo neuronal, y en la terminal, reduciendo la síntesis y liberación del neurotransmisor. Los autorreceptores son hasta 10 veces más sensibles a la dopamina que los receptores postsinápticos (D1, D3 y D4) por lo que a bajas dosis la dopamina actuaría sobre receptores presinápticos, y a dosis más altas se activarían también los receptores postsinápticos (Baskys y Remington, 1996).

.Vías dopaminérgicas

Las vías dopaminérgicas se pueden dividir según su longitud en (Cooper et al., 1996):

- Ultracortas:
 - Implexiformes: células amacrinas de la retina.
 - Células dopaminérgicas periglomerulares: en el bulbo olfatorio.
- Intermedias:
 - Tuberohipofisarias: desde el núcleo arcuato y periventricular a eminencia media y lóbulo intermedio de la hipófisis.
 - Incertohipotalámicas: desde el hipotálamo dorsal y ventral al hipotálamo dorsal anterior y núcleo septal lateral.

Ambas vías están implicadas en el control de la secreción hormonal, principalmente de prolactina.

- Periventriculares: incluye neuronas del perímetro del núcleo motor dorsal del vago y del núcleo del tracto solitario.
- Largas:
 - Mesolímbica: desde A10 proyecta a núcleo accumbens y a amígdala, está relacionada con el sistema de recompensa y con el mecanismo de adicción a drogas.
 - Mesocortical: desde A10 a corteza límbica (áreas medialfrontal, cingulada y entorrinal), esta vía está relacionada con el mecanismo de adicción a drogas de abuso.

Tanto la vía mesolímbica como la mesocortical están implicadas en procesos de memoria, recompensa y control emocional (Mora y Cobo, 1990).

- Nigroestriatal: desde sustancia negra *pars compacta* hasta cuerpo estriado. Esta vía participa en el control del movimiento involuntario, el control postural y del tono muscular.

3.3.2. DOPAMINA, SUS METABOLITOS Y RITMOS CIRCADIANOS

Existen datos que sugieren una función de la dopamina en relación con los ritmos circadianos. Los más abundantes son los relacionados con el ciclo sueño-vigilia, uno de los ritmos circadianos más estudiados. Durante este ciclo no se observa un aumento global de la dopamina en corteza durante ninguna de las fases, pero si existe un incremento de los niveles de dopamina en algunas áreas corticales concretas durante el periodo de vigilia por lo que la dopamina podría estar modulando el estado de vigilia (Andres et al., 1998). Existen, además, fibras dopaminérgicas que se dirigen desde sustancia negra a corteza aunque parecen más

relacionadas con la iniciación de la actividad motora propia del periodo de vigilia que con el estado de vigilia en sí (Shepherd, 1988).

Por otro lado, se han observado variaciones circadianas de los niveles extracelulares de dopamina, DOPAC y HVA en el estriado dorsal de la rata, mientras que en el estriado ventral (núcleo accumbens) se observan variaciones circadianas de los metabolitos pero no de dopamina (Paulson y Robinson, 1994). Estos mismos autores describen posteriormente un ritmo circadiano en las concentraciones extracelulares de dopamina en núcleo accumbens, aunque menos marcado que en estriado (Paulson y Robinson, 1996).

En corteza prefrontal se han descrito variaciones circadianas de dopamina y sus metabolitos (Nakayama et al., 1993) Algunos trabajos describen variaciones de aproximadamente 24 horas en el número de receptores dopaminérgicas en el área prosencefálica en animales sincronizados con el ciclo oscuridad-luz (Kafka et al., 1985).

Estos datos sugieren un aumento de actividad dopaminérgica durante el periodo de oscuridad, que es el periodo activo de la rata.

3.4. ACETILCOLINA

La acetilcolina ha sido identificada hace décadas, pero su distribución y funciones en el sistema nervioso central no han sido estudiadas en profundidad por su dificultad para encontrar marcadores específicos para neuronas colinérgicas. Actualmente se usan marcadores de la enzima de síntesis (colina-acetiltransferasa) y de degradación (acetilcolinesterasa) de acetilcolina para localizar las neuronas colinérgicas (Hasey, 1996). La neuronas colinérgicas se distribuyen tanto en sistema nervioso central como en periférico, e incluso se encuentra acetilcolina en órganos fuera del sistema nervioso como la córnea o en la placenta (Taylor y Brown, 1999).

Las funciones de la acetilcolina en el sistema nervioso central están relacionadas con procesos de consolidación de memoria y componentes emocionales en áreas corticales y límbicas; con la transición de sueño a vigilia, el mantenimiento del sueño REM y el nivel de alerta en tálamo; y en el control de la actividad motora en estriado (Artigas, 1998; Pepeu y Giovannini, 2004). La alteración del sistema colinérgico está implicada en la patogenia de los desordenes psicoafectivos, la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer (Muir, 1996; Levin y Simon, 1998; Holt et al., 1999; Sarter y Bruno, 1999).

3.3.1. NEUROTRANSMISIÓN COLINÉRGICA

.Metabolismo de la acetilcolina

La acetilcolina se sintetiza en el terminal *colinérgico* a partir de colina y acetilcoenzima A por medio de la colina-acetiltransferasa dando como productos acetilcolina y coenzima A. La colina-acetiltransferasa tiene una actividad enzimática mayor *in vitro* que *in vivo*, por lo que se ha sugerido que la enzima está normalmente inhibida. Por lo tanto este paso enzimático no es el limitante en la síntesis de acetilcolina *in vivo* (Cooper et al., 1996).

La acetilcoenzima A es producto del ciclo de Krebs y se sintetiza en la cara interna de las mitocondrias. Aún no se conoce cómo este compuesto llega hasta el citoplasma para

convertirse en sustrato de la enzima colina-acetiltransferasa. Por su parte la colina proviene del plasma, del metabolismo extracelular de la acetilcolina previamente liberada o de la degradación de fosfatidilcolina. En el sistema nervioso central, estas fuentes metabólicas son especialmente importantes ya que la colina plasmática no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. La colina es incorporada al interior de la neurona mediante un transportador de alta afinidad, dependiente de Na^+ y sensible al potencial de membrana, debido a lo cual el transporte puede ser inhibido por agentes despolarizantes (Cooper et al., 1996). Por otro lado la actividad de la propia neurona parece modular la velocidad de entrada de colina al interior celular, aunque este mecanismo de regulación no se ha descrito en todas las áreas cerebrales. El transporte de colina es el paso limitante, y principal regulador, de la síntesis de acetilcolina (Cooper, 1996; Taylor y Brown, 1999).

El catabolismo de la acetilcolina se realiza principalmente por hidrólisis. La enzima acetilcolinesterasa se acetila formando un compuesto de corta duración ($10\mu\text{seg}$) convirtiendo la acetilcolina en colina y ácido acético (Taylor y Brown, 1999). La acetilcolinesterasa se encuentra tanto unida a membranas como soluble en el medio extracelular (Cooper et al., 1996; Taylor y Brown, 1999).

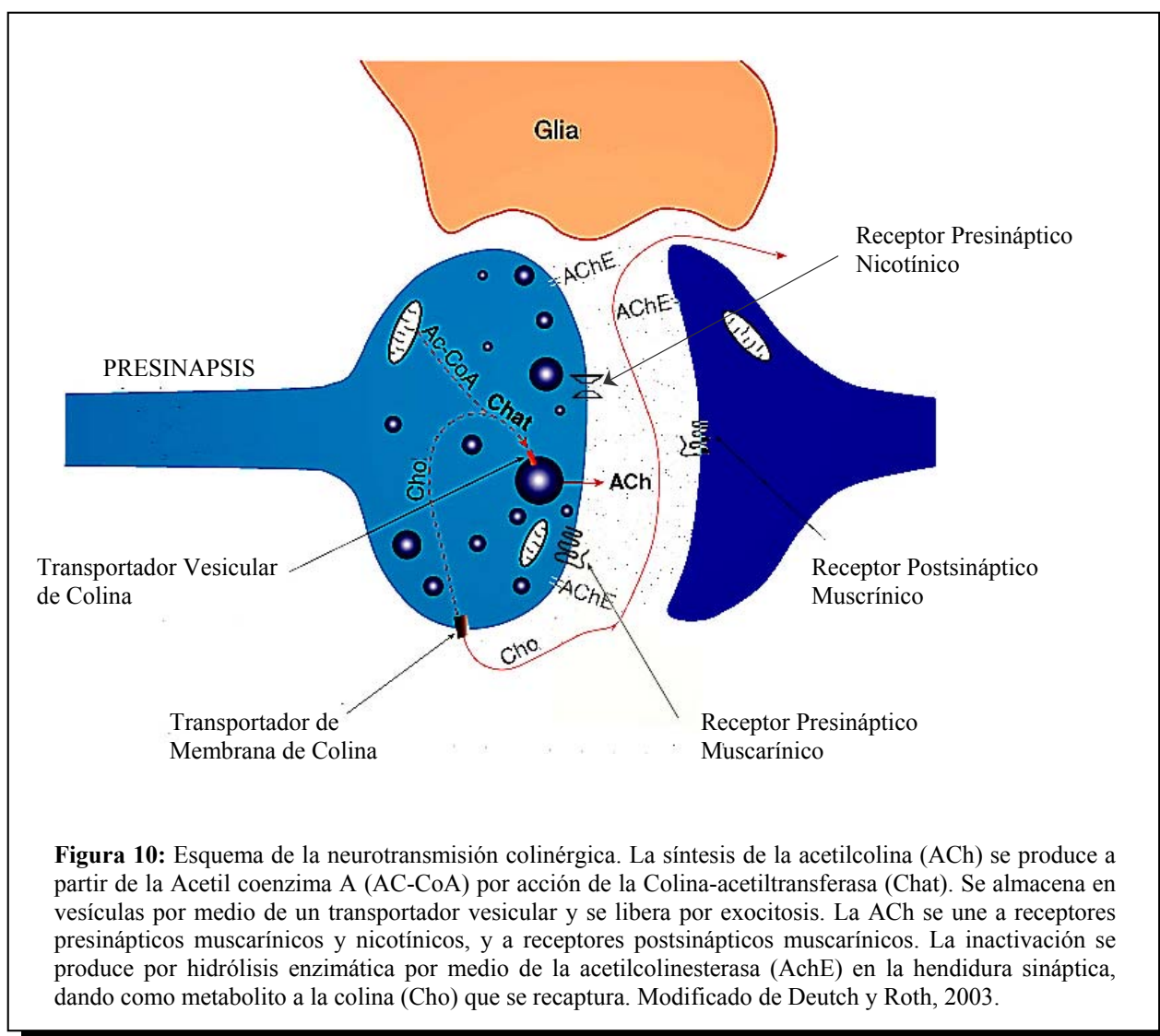


Figura 10: Esquema de la neurotransmisión colinérgica. La síntesis de la acetilcolina (ACh) se produce a partir de la Acetil coenzima A (AC-CoA) por acción de la Colina-acetiltransferasa (Chat). Se almacena en vesículas por medio de un transportador vesicular y se libera por exocitosis. La ACh se une a receptores presinápticos muscarínicos y nicotínicos, y a receptores postsinápticos muscarínicos. La inactivación se produce por hidrólisis enzimática por medio de la acetilcolinesterasa (AChE) en la hendidura sináptica, dando como metabolito a la colina (Cho) que se recaptura. Modificado de Deutch y Roth, 2003.

.Almacenamiento, liberación e inactivación

Una vez sintetizada, la acetilcolina se almacena en vesículas a través de un transportador específico dependiente de ATP acoplado a una bomba de protones. Este transportador intercambia moléculas de acetilcolina con protones, manteniendo así el equilibrio osmótico y eléctrico de la vesícula. Este transportador es inhibido por vesacimol (Taylor y Brown, 1999) (ver figura 10).

La liberación de la acetilcolina es dependiente de Ca^{2+} (Cooper et al., 1996). El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la fusión de las vesículas con la membrana plasmática de la terminal y el neurotransmisor es liberado por exocitosis junto con ATP a la hendidura sináptica.

La inactivación del neurotransmisor acetilcolina se realiza por su degradación en la hendidura sináptica mediante la acetilcolinesterasa dando como metabolito colina (Cooper et al., 1996).

.Receptores

Los receptores de acetilcolina se dividen en dos tipos, tanto en sistema nervioso central como en periférico: Nicotínicos y Muscarínicos, que difieren tanto en su localización como en su farmacología. Los receptores nicotínicos son activados por nicotina y bloqueados por curare mientras que los muscarínicos son activados por muscarina y bloqueados por atropina o hexamentonio (Taylor y Brown, 1999).

Los receptores nicotínicos pertenecen a la familia de receptores asociados a canales iónicos. Tras la unión del ligando se produce un cambio conformacional en la proteína que forma el receptor, abriéndose el canal y permitiendo el paso Na^+ . La respuesta de este receptor es rápida y corta.

En las neuronas del sistema nervioso central, el receptor es un pentámero formado por la combinación de dos subunidades α y β . Se han descrito un amplio número de combinaciones, no todas funcionales, de las cuales la abundantes en el sistema nervioso central de mamíferos son la combinación heteromérica $\alpha 4\beta 2$ y la homomérica $\alpha 7$ (Taylor y Brown, 1999; Sharples y Wonnacott, 2001).

	RESPUESTA CELULAR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	LOCALIZACIÓN
$\alpha 4\beta 2^*$	$\uparrow \text{Na}^+$	Trans-metanicotina, nicotina	Dihidro- β -eritroidina, d-tubocuranina, mecamilamina	Mesencéfalo, Corteza, Neostriado
$\alpha 7$	$\uparrow \text{Na}^+$	Anabasina, nicotina	α -bungarotoxina, d-tubocuranina, mecamilamina	Corteza, Estriado, Hipocampo, Amígdala

Tabla 5: Características y distribución de los receptores de nicotínicos (Hasey, 1996; Taylor y Brown, 1999; Sharples y Wonnacott, 2001).

Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G de membrana. Ejercen su acción a través de la proteína G regulando canales de iónicos, principalmente de K^+ , o asociados a sistemas de segundos mensajeros que, a través de APMc,

GMPC, aumentos de Ca^{2+} citosólico o por productos de la hidrólisis del fosfatidilinositol, producen la apertura o cierre de canales de K^+ , Ca^{2+} o Cl^- según el tipo de célula, de esta forma la activación de los receptores muscarínicos puede producir tanto despolarización como hiperpolarización según el tipo celular (Cooper et al, 1996; Taylor y Brown, 1999). La respuesta de estos receptores es más lenta y larga que la de los nicotínicos.

	RESPUESTA CELULAR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	LOCALIZACIÓN
M1	$\uparrow IP_3$, $\uparrow Ca^{2+}$	Muscarina, Pilocaroina, Oxotremorida	Piracepina	Hipocampo, Corteza, Estríado, Tubérculo Olfatorio, Cerebro Medio
M2	$\downarrow AMPc$, K^+	Muscarina, Pilocaroina, Oxotremorida	Metocramina, AF-DX116	Cerebelo, Tronco del Encéfalo, Cerebro Medio, Tubérculo Olfatorio, Hipocampo
M3	$\uparrow IP_3$, $\uparrow Ca^{2+}$	Muscarina, Pilocaroina, Oxotremorida	Hexahidrosiladifenidol	Hipocampo, Estríado, Corteza
M4	$\downarrow AMPc$, K^+	Muscarina, Pilocaroina, Oxotremorida	4-DAMP	Estríado, Tubérculo Olfatorio, Corteza
M5	$\uparrow IP_3$, $\uparrow Ca^{2+}$	Muscarina, Pilocaroina, Oxotremorida	4-DAMP	Muy baja densidad en todas las áreas

Tabla 6: Características y distribución de los receptores de muscarínico. IP_3 : inositoltrifosfato (Cooper et al., 1996; Artigas, 1998; Taylor y Brown, 1999)

Se han caracterizados cinco subtipos de receptor muscarínico (M1-M5), según su afinidad por los antagonistas y su estructura (Taylor y Brown, 1999). En el sistema nervioso de mamíferos, los receptores M2 y M4 se localizan presinápticamente y están acoplados a proteínas G_i que inhiben la formación de AMPc; mientras que los receptores M1 y M5 se localizan postsinápticamente y están acoplados a proteínas G_q que estimulan la hidrólisis de fosfatidilinositol en inositol-tri-fosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG).

.Vías acetilcolinérgicas

La distribución de las vías colinérgicas en el cerebro de mamífero tiene dos patrones: como interneuronas y como vías de proyección largas:

Las interneuronas colinérgicas se localizan principalmente en estríado y núcleo accumbens, aunque también se han descrito en corteza cerebral y en las islas de Calleja (Cuello y Sofroniew, 1984). Se ha sugerido que las interneuronas colinérgicas de estríado y núcleo accumbens podrían tener un papel fundamental en las alteraciones psicomotoras asociadas a los trastornos del estado de ánimo (Hasey, 1996).

Las vías de proyección largas se dividen en (Hasey, 1996):

- La proyección colinérgica dorsal, que se distribuye en un patrón columnar que parte del núcleo basal magnocelular, que incluye el núcleo de la banda lateral y la sustancia innominada, el núcleo de la banda diagonal de Broca y el núcleo preóptico magnocelular (Cuello y Sofroniew, 1984; Hasey, 1996). Estos núcleos inervan de manera difusa al bulbo olfatorio, hipocampo, amígdala y corteza cerebral. Esta proyección está implicada en los procesos de memoria.
- La proyección colinérgica caudal, que se origina en el área tegmental de la protuberancia y los núcleos laterodorsal y pedúnculo pontino; y proyectan al núcleo interpeduncular y a tectum, así como a hipotálamo, tálamo, hipocampo, amígdala y corteza prefrontal. Esta proyección participa en funciones cognitivas como el mantenimiento del nivel de consciencia en la integración de la actividad límbico y somatomotora.
- Las neuronas protomesencefálicas se distribuyen extensamente por el tallo cerebral, contactando con el sistema reticular ascendente. Estas neuronas participan en la regulación del ciclo sueño vigilia.

3.3.2. ACETILCOLINA Y RITMOS CIRCADIANOS

La acetilcolina es un importante regulador de la actividad del núcleo supraquiasmático. Se ha descrito que las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal envían proyecciones al núcleo supraquiasmático (Bina et al., 1993). Se han descrito receptores colinérgicos en el núcleo (Van der Zee et al., 1991) y la perfusión de agonistas colinérgicos en esta estructura produce una modificación de fase en su actividad circadiana (Ferguson et al., 1999).

El sistema colinérgico participa, además, en la regulación del ciclo sueño vigilia. La formación reticular de tallo cerebral y mesencefálica envía proyecciones colinérgicas a corteza, manteniendo el nivel de activación durante la vigilia. Las neuronas colinérgicas mesopontinas participan en la regulación de la alternancia entre los ciclos REM y no-REM, propiciando inicio y mantenimiento del sueño REM (Andres et al., 1998).

Por último, se han descrito variaciones circadianas de las concentraciones extracelulares de acetilcolina en corteza prefrontal, corteza somatosensorial, hipocampo y estriado (Day et al., 1991; Kametani y Kawamura, 1991; Mizuno et al., 1991; Jimenez-Capdeville y Dykes, 1993; Mitsushimo et al., 1996).

Planteamiento y Objetivos

Se conoce como ritmos biológicos a la recurrencia de fenómenos en un sistema biológico con intervalos regulares (Mora y Sanguinetti, 2004). Casi todas las funciones fisiológicas del organismo presentan una variación rítmica y además están coordinadas entre sí. Los primeros estudios sobre ritmos circadianos en el sistema nervioso central estaban encaminados a localizar el marcapasos principal o reloj circadiano que controla estas variaciones diarias. Este marcapasos principal se ha localizado en el núcleo supraquiasmático. En 1972 se observó que la lesión o daño en dicho núcleo eliminaba los ritmos circadianos de actividad motora en mamíferos (Moore y Eichler, 1972), estudios posteriores comprobaron esta pérdida del ritmo circadiano de actividad motora y de otras funciones circadianas como la bebida o la temperatura corporal (Kafka et al., 1985; Satinoff et al., 1988; Meijer y Rietveld, 1989; Albers et al., 1992), y que estos ritmos se recuperan al transplantar tejido de núcleo supraquiasmático a animales con esta área lesionada (Ralph et al., 1990). El núcleo supraquiasmático coordina los ritmos circadianos a través de conexiones neuronales con otras áreas del sistema nervioso (Meijer y Rietveld, 1989; Moore y Leak, 2001) y de la hormona melatonina (Meijer y Rietveld, 1989; Reiter, 1993; Gorman et al., 2001).

Las funciones fisiológicas del organismo están codificadas o reguladas por circuitos específicos distribuidos en diferentes áreas del cerebro. Estos circuitos están integrados por distintos sistemas de neurotransmisores. A pesar de la importancia de los sistemas de neurotransmisores en el funcionamiento del cerebro, existen muy pocos trabajos que estudien la relación entre neurotransmisores y ritmos circadianos. Algunos estudios han observado variaciones circadianas en distintos neurotransmisores como por ejemplo, las concentraciones extracelulares de glutamato y aspartato en el núcleo supraquiasmático (Honma et al., 1996), la dopamina tiene un ritmo circadiano en retina de conejo (Nowak y Zurawska, 1989), en estriado (Paulson y Robinson, 1992; Márquez de Prado et al., 2000; Castañeda et al., 2004) y en núcleo accumbens (Paulson y Robinson 1994; Castañeda et al., 2004), y la serotonina cambia sus niveles extracelulares en corteza en respuesta a la transición noche-día (Rueter y Jacobs, 1996).

El objetivo de esta tesis doctoral es el estudio de los ritmos circadianos de neurotransmisores en la corteza prefrontal de la rata. A pesar de que existen evidencias de que funciones de la corteza prefrontal están reguladas de manera circadiana, muy poco se sabe acerca de los ritmos circadianos de los neurotransmisores, que son los que subyacen a las funciones codificadas en parte por esta área cerebral. Se ha descrito que la corteza prefrontal está implicada en funciones que están sujetas a variaciones circadianas, como por ejemplo la memoria de trabajo (Monk et al., 1997; Wright et al., 2002), el estado de ánimo (Owens et al., 2000; Adan and Sánchez-Turet, 2001) o la atención (Kraemer et al. 2000) y que estos ritmos se afectan al alterar el patrón circadiano de actividad normal (Florida-James et al., 1996; Cho et al., 2000). Además existe una vía multisináptica que conecta a la corteza prefrontal medial con el núcleo supraquiasmático, vía el núcleo paraventricular del tálamo (Sylvester et al., 2002).

Las características neuroquímicas de la corteza prefrontal han sido ampliamente estudiadas (Mora y Ferrer, 1986; Fuster, 1997; Del Arco, 2000). Recibe aferencias glutamatérgicas de otras áreas de corteza y de tálamo, además contiene neuronas piramidales de proyección glutamatérgicas que proyectan a estriado y núcleo accumbens, entre otras estructuras, y que emiten colaterales recurrentes que vuelven a la corteza prefrontal (Peinado y Mora, 1986; Mora y Ferrer, 1986; De Felipe y Fariñas, 1992; Del Arco, 2000). También contiene interneuronas GABA conectadas recíprocamente con las neuronas piramidales y recibe

aferencias mesencefálicas dopaminérgicas, en concreto del área tegmental ventral, y colinérgicas del telencéfalo basal, principalmente de septum, núcleo de la banda diagonal de Broca y núcleo basal de Meynert (*sustancia innominata*) (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990; Berger et al., 1991; Fuster, 1997). Esto hace de la corteza prefrontal una estructura de interés relevante para estudiar los ritmos circadianos de distintos sistemas de neurotransmisores.

Nuestro primer objetivo en este trabajo fue estudiar los posibles ritmos circadianos de glutamato, GABA y dopamina, así como de su metabolito HVA, en la corteza prefrontal. Una vez descritos los ritmos circadianos en las concentraciones extracelulares de neurotransmisores de la corteza prefrontal quisimos estudiar su regulación por cambios en el fotoperíodo, puesto que la luz es el principal sincronizador exógeno de los ritmos circadianos (Gorman et al., 2001; Meijer, 2001; Erren et al., 2003), y de la melatonina, que es la principal eferencia hormonal del núcleo supraquiasmático y cuya función es sincronizar los ritmos circadianos y estacionales del organismo (Reiter, 1993; Gorman et al., 2001). Se estudiaron también los efectos del envejecimiento sobre estos ritmos circadianos así como sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en estriado y núcleo accumbens, áreas también inervadas por las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, cuyos ritmos circadianos han sido previamente estudiados en nuestro laboratorio (Márquez de Prado et al., 2000; Castañeda et al. 2004).

Estos objetivos se desarrollan en la presente tesis doctoral, a través de los siguientes bloques experimentales:

BLOQUE EXPERIMENTAL 1: Estudio de los ritmos circadianos de neurotransmisores en Corteza Prefrontal y de actividad motora:

- Estudio de las concentraciones extracelulares del glutamato, dopamina y GABA en la Corteza Prefrontal de la rata despierta y del nivel de actividad motora.

BLOQUE EXPERIMENTAL 2: Efectos de los cambios en el ciclo oscuridad/luz en los ritmos circadianos de neurotransmisores de la Corteza Prefrontal y de actividad motora:

- Estudio de las concentraciones extracelulares de glutamato y dopamina en la Corteza Prefrontal y de los niveles de actividad motora de la rata despierta durante un ciclo 12h oscuridad:12h luz, un ciclo 6h oscuridad:18h luz y un ciclo 24h oscuridad.

BLOQUE EXPERIMENTAL 3: Estudio de los ritmos circadianos de acetilcolina y colina en la corteza prefrontal y de actividad motora.

BLOQUE EXPERIMENTAL 4: Efecto de la perfusión de local de melatonina en Corteza Prefrontal sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores y de actividad motora de la rata despierta:

- Estudio del efecto de la perfusión de local de melatonina (200 y 500 μ M) en Corteza Prefrontal sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina neurotransmisores en el mismo área de la rata despierta y de actividad motora de la rata despierta.

BLOQUE EXPERIMENTAL 5: Efecto del proceso de envejecimiento sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en la Corteza Prefrontal y de actividad locomotora. Estudios comparativos con ganglios basales:

5.1. Estudio del efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en la Corteza Prefrontal en ratas de edad joven (2-4 meses) y de edad vieja (23-25 meses).

5.2. Estudio del efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en el Estriado en ratas de edad joven (2-4 meses) y de edad vieja (23-25 meses).

5.3. Estudio del efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadiano de glutamato, dopamina y acetilcolina en el Núcleo Accumbens en ratas de edad joven (2-4 meses) y de edad vieja (23-25 meses).

5.4. Estudio del efecto del envejecimiento sobre el ritmo circadiano de actividad motora en ratas de edad joven (2-4 meses) y de edad vieja (23-25 meses)

*Material
y Métodos*

1. ANIMALES.

Los animales utilizados en el presente trabajo de investigación fueron ratas adultas macho de raza Wistar, con un peso comprendido entre 250 y 350 g, que corresponde a una edad de 2 a 4 meses. Las ratas fueron suministradas por el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (ANUC) y el Animalario de la Universidad de Granada.

Durante la experimentación, los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo invertido luz/oscuridad de 12 h (la luz se apaga a las 8 a.m. y se enciende a las 8 p.m.) y una temperatura constante de 24 °C. La comida y la bebida fueron suministradas *ad libitum*.

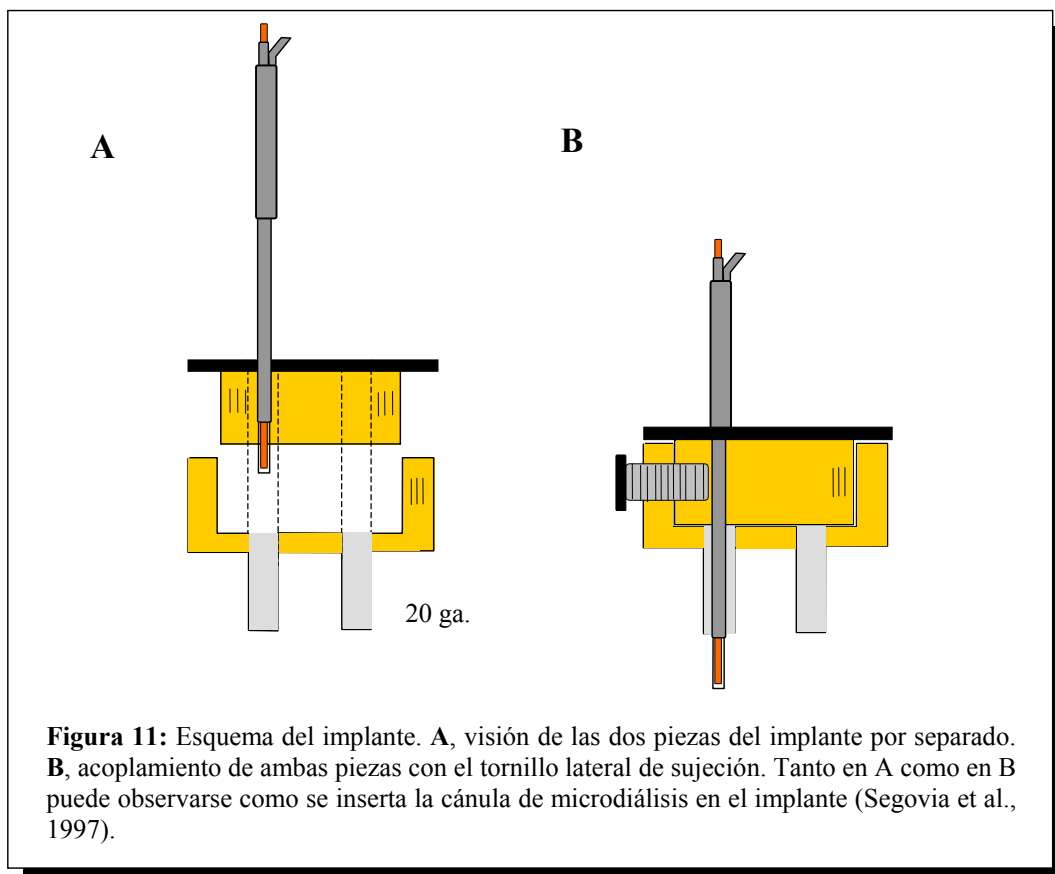
2. MATERIAL.

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

Los implantes empleados para la perfusión intracerebral *in vivo* en la corteza prefrontal fueron diseñados en nuestro laboratorio (Segovia et al., 1997). Para la perfusión intracerebral en otras estructuras, ver modificaciones en el bloque experimental correspondiente. Los implantes constan de los siguientes elementos (figura 11):

- dos piezas de nailon acoplables según un sistema macho-hembra, construidas por el Taller de Asistencia Técnica a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid (UCM)
- un tornillo de 3 mm de diámetro
- dos cánulas guías de acero inoxidable de 902 μm de diámetro externo, 660 μm de diámetro interno y 8 mm de longitud
- dos cánulas de acero inoxidable o fiadores de 635 μm de diámetro externo y 8.2 mm de longitud.

Las cánulas guías se unen a la base de la pieza de nailon hembra con epoxi. Este conjunto se implanta en el cráneo de la rata con el propósito de guiar el sistema de cánulas de microdiálisis hasta el área cerebral a estudiar. Hasta el momento de realizar el experimento las cánulas guías son ocluidas con fiadores de acero inoxidable. Para proceder a la perfusión intracerebral se acopla la pieza de nailon macho en la pieza hembra permitiendo que el extremo de la cánula (la membrana dialítica) esté protegido durante su inserción (figura 11 A). Todo el sistema macho-hembra es atravesado por un orificio perpendicular al eje principal, por el que se introduce un tornillo, que fija la cánula de microdiálisis durante el desarrollo del experimento.



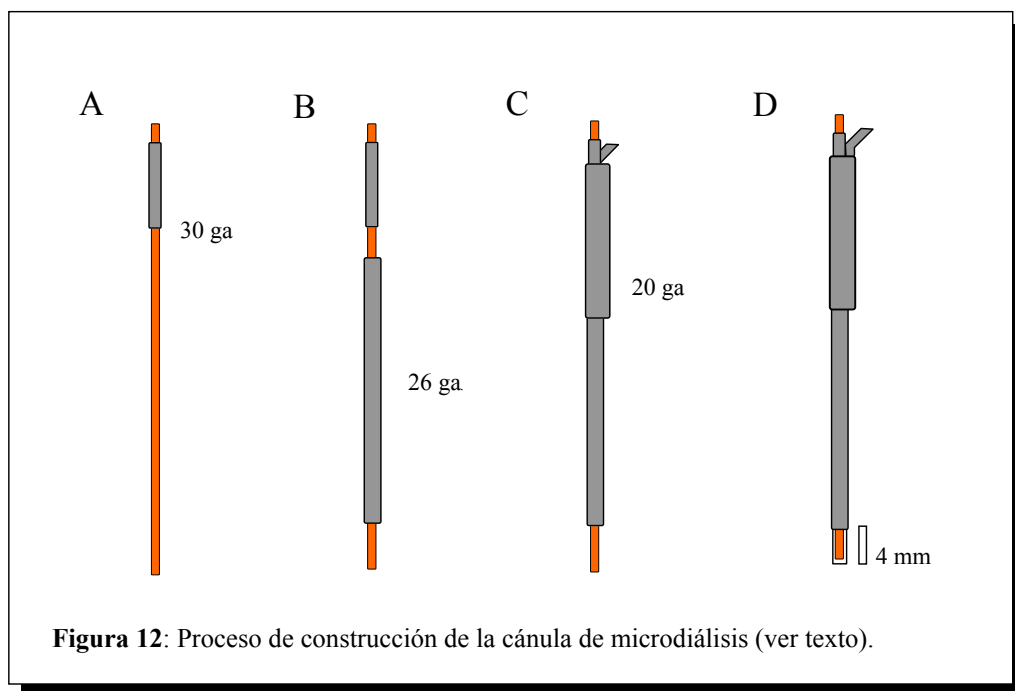
2.2. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE CÁNULAS DE MICRODIÁLISIS.

Las cánulas de microdiálisis para los experimentos en la corteza prefrontal, se diseñaron y construyeron en nuestro laboratorio (Segovia et al., 1997). Para las cánulas usadas en los experimentos de las otras estructuras, ver las modificaciones en el bloque experimental correspondiente. El material utilizado en el proceso fue el siguiente:

- dos cánulas de acero inoxidable de 305 μm de diámetro externo (30 ga), 152 μm de diámetro interno y 10 mm de longitud
- una cánula de acero inoxidable de 457 μm de diámetro externo (26 ga), 254 μm de diámetro interno y 30 mm de longitud.
- una cánula de acero inoxidable de 902 μm de diámetro externo (20 ga), 660 μm de diámetro interno y 15 mm de longitud.
- un capilar de silica de 144 μm de diámetro externo, 75 μm de diámetro interno y 55 mm de longitud.
- membrana de diálisis, de cuprofano, de 10 mm de longitud y tamaño de poro de 200 μm (5000 D).

La figura 12 ilustra el proceso de construcción de la cánula de microdiálisis: **A**, a una de las cánulas de 30 ga se une el capilar de silica mediante cianocrilato, de manera que la silica sobresalga alrededor de 1 mm por uno de los extremos de la cánula de acero inoxidable. **B**, seguidamente por el extremo contrario de la silica se inserta la cánula de 26 ga de manera que sobresalga la silica 2 mm. **C**, a continuación, el conjunto de cánulas y silica se inserta en la

cánula de 20 ga añadiendo, pegada a su gemela, la otra cánula de 30 ga ligeramente doblada. Los extremos de la cánula de 20 ga se sellan con epoxi de manera que quede una cámara en el interior. **D**, finalmente, bajo una lupa y con ayuda de un hilo de tungsteno se coloca la membrana de diálisis dejando un espacio de 0.5 mm entre el extremo de la silica y el extremo de la membrana de diálisis de forma que queden 4 mm de superficie de intercambio. Ambos extremos de la membrana se sellan con unas gotas de cianocrilato. Se coloca un tope de polietileno de manera que el trozo de la pieza de 26 ga que queda fuera del polietileno se de 15,5 mm. De este modo cuando la cánula se introduce en el cerebro a través de la cánula guía queda a la altura de la corteza prefrontal.



2.3 PREPARACIÓN DEL ANESTÉSICO (EQUITHESIN)

El anestésico Equithesin fue preparado en nuestro laboratorio, mediante del siguiente proceso secuencial (para 500 ml):

- disolver 21.25 g de hidrato de cloral (Sigma) en 49.4 ml de etanol absoluto (Panreac);
- añadir 4.86 g de pentobarbital sódico (Sigma) disueltos previamente en 21 ml de agua bidestilada;
- agregar 198 ml de 1,2-propilenglicol (Merck);
- añadir 10.63 g de sulfato magnésico (Merck) disueltos previamente en 50 ml de agua bidestilada;
- enrasar hasta 500ml con agua bidestilada.

La solución así obtenida debe conservarse a temperatura ambiente.

3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO: ESTEREOTAXIA

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

- estereotáxico para roedores (David Kopf Instruments 900)
- bisturí
- pinzas hemostáticas
- Espongostan Film (Ferrosan)
- motor porta brocas (Casali DSE-47)
- broca de 1 mm de diámetro
- tornillos de 1.4 mm de diámetro
- aguja de insulina (25 ga)
- destornillador de relojero
- espátula recta
- resina plástica Ivoclar (International Dental Products)
- tornillo de 3 mm de diámetro y 20 mm de longitud.

Tanto el instrumental quirúrgico como el implante se mantuvieron en una solución desinfectante (Armil al 1 por 1000) durante toda la intervención.

Previamente a la operación, las ratas se pesan y anestesian con Equitesín vía intraperitoneal a la dosis de 2 mg/kg. Una vez que el animal está profundamente anestesiado, se coloca en el aparato estereotáxico pinzando el maxilar superior 4 mm por debajo de la línea interaural. Mediante una incisión longitudinal de la piel que cubre el cráneo se deja al descubierto la calota del animal. Se abre el campo quirúrgico mediante pinzas hemostáticas y tras controlar la hemorragia secundaria al corte de tejidos, se localiza el punto Bregma (punto de coincidencia de las suturas interparietal y frontoparietal). Este punto se utiliza como referencia para calcular las coordenadas estereotáxicas anteroposterior y lateral, que para la corteza prefrontal son +3.6mm en el eje antero-posterior y ± 0.9 mm en el eje lateral (König y Klippel, 1967).

A continuación, empleando una broca se abren cuatro orificios en la calota, dos para el emplazamiento de los tornillos de fijación, y dos para las cánulas guías. En uno de estos últimos orificios se localiza la duramadre y se toma como referencia para hallar la coordenada ventral. Una vez rasgada la duramadre con la punta de una aguja de insulina, se introduce la cánula guía 0.5 mm por debajo de la superficie dural (König y Klippel, 1967). Para ver las coordenadas estereotáxicas de las otras estructuras, ver el bloque experimental correspondiente.

El implante se fija a la calota con la resina acrílica de forma que esta englobe los tornillos de fijación, la base del implante y la cabeza de un tornillo de hierro de 3 mm de diámetro y 20 mm de longitud colocado en la parte posterior con el fin de anclar el sistema de perfusión al implante.

Antes de retirar la rata del estereotáxico se introducen los fiadores en las cánulas guías para evitar su oclusión por los restos de tejido o hemorragias. Tras la operación se coloca al animal en su jaula y se vigila su peso durante los días siguientes a la intervención. Diariamente se movilizan los fiadores y se limpian con etanol al 70% con el propósito de mantener desinfectadas las cánulas guías y evitar su posible obstrucción.

3.2. PERFUSIÓN INTRACEREBRAL IN VIVO

La perfusión intracerebral *in vivo* se realizó mediante el sistema de cánulas de microdiálisis descrito en el apartado 2.2. de este capítulo. Este sistema permite el paso continuo de un líquido de perfusión a través de la membrana de diálisis ubicada en el área del cerebro que queremos estudiar. Esta membrana dialítica recoge las sustancias químicas presentes en el fluido intersticial por gradientes de concentración, lo que permite la obtención de muestras que posteriormente serán analizadas con el fin de cuantificar los componentes neuroquímicos extraídos del animal despierto.

Los experimentos de perfusión se realizaron entre 10 y 15 días después de la intervención quirúrgica. El líquido de perfusión utilizado fue líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs), cuyo pH es de 7.3 y cuya composición fue: NaCl 137 mM; KCL 3 mM; CaCl₂ 1.2 mM; MgSO₄ 1 mM; NaH₂PO₄ 0.5 mM; Na₂HPO₄ 2 mM; Glucosa 3mM. En el caso de los experimentos de corteza se usó un LCRs que contenía Nomifensina 5μM para elevar la dopamina a niveles detectables. El flujo de perfusión fue de 1.25 μl/min y, tras 3 horas de estabilización, se recogieron muestras cada 30 minutos durante 24 horas. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

3.2.1. Protocolo experimental

El experimento comienza con la puesta a punto del sistema de perfusión, que consta de los siguientes elementos:

- una bomba de infusión Harvard 22
- dos jeringas Hamilton de 5 ml
- una válvula Harvard HV 4-4 de cuatro vías
- un soporte giratorio (swivel) diseñado y construido en nuestro laboratorio que consta de sistema de anclaje al implante del animal
- tubos de polietileno de 20 y 26 ga
- una cánula de microdiálisis

Una vez conectados todos los elementos del sistema como se muestra en las figuras 8 y 9, se pone en marcha la bomba de infusión cargada con las dos jeringas Hamilton de LCRs a un flujo de 1.25 μl/min. Se inicia la perfusión de LCRs a través de la cánula con el objetivo de crear presión hidrostática sobre la membrana que le dé rigidez suficiente para evitar así su colapso durante la inserción en el tejido cerebral.

A continuación se siguen los siguientes pasos de manera secuencial: primero, anclaje del sistema de perfusión al implante a través del soporte giratorio, que permite libertad de movimientos al animal, segundo, introducción de la cánula de microdiálisis a través del implante hasta llegar a un tope calculado para que la parte activa de la sonda esté en el área a

estudiar, tercero, inmovilización de la cánula de microdiálisis con el tornillo perpendicular al eje principal incorporado en el implante.

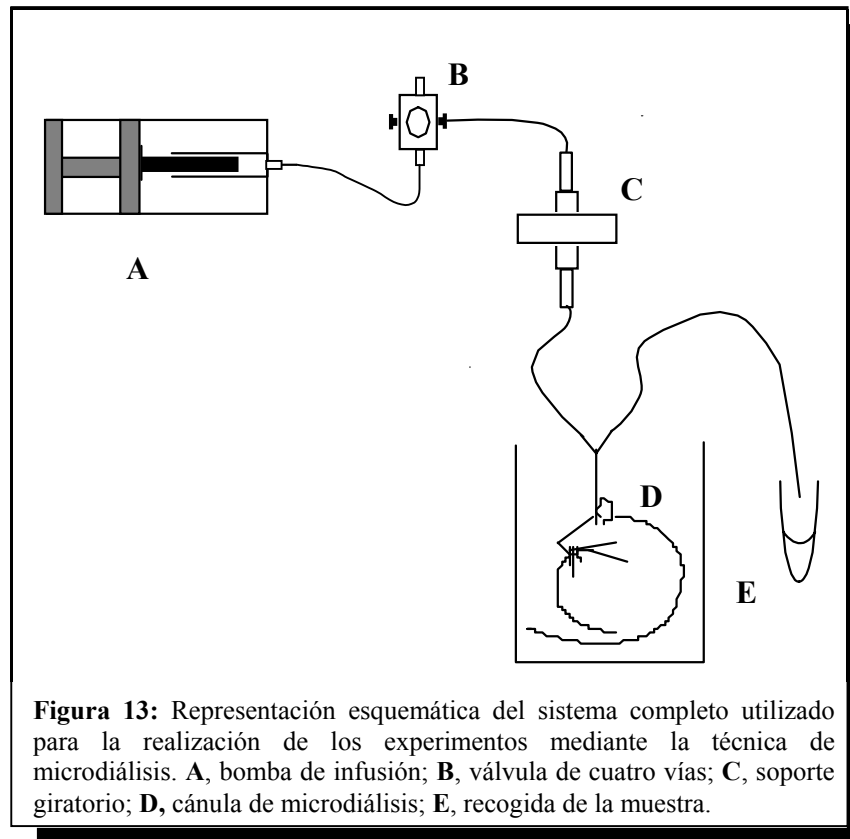
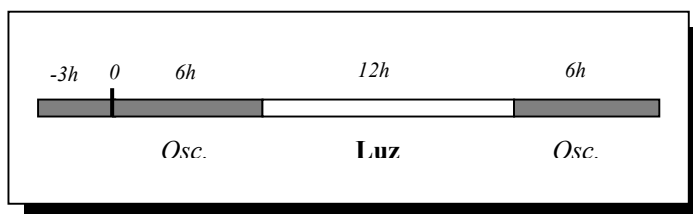


Figura 14: Fotografía que muestra en detalle el anclaje del sistema de perfusión al implante durante uno de los experimentos de perfusión intracerebral.

3.2.2. Protocolo de perfusión

La perfusión se realizó a un flujo de 1.25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se recogieron perfundidos correspondientes a periodos de 30 minutos, secuencialmente y durante toda la perfusión (excepto en el periodo de estabilización). Los perfundidos obtenidos se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis. El protocolo general quedó establecido de la siguiente manera:

- 1- Periodo de estabilización, de 3 horas de duración, durante el cual se obtiene la estabilización en las concentraciones de las sustancias analizadas.
- 2- Primer periodo de oscuridad: de 6 horas de duración.
- 3- Periodo de luz: de 12 horas de duración.
- 4- Segundo periodo de oscuridad: de 6 horas de duración.



Durante toda la perfusión el animal tuvo acceso a comida y bebida *ad libitum*.

Las modificaciones del protocolo experimental general vienen recogidas en los distintos bloques experimentales.

3.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD MOTORA

Para medir la actividad motora espontánea se utilizaron bastidores de 34 x 35 cm de perímetro externo, 28 x 28.5 cm de perímetro interno y 10.5 cm de altura. Cada bastidor contiene dos filas de 8 fotocélulas en dos lados consecutivos. Las fotocélulas están separadas entre sí 3.5 cm y están a una altura de 10 cm desde la base. La actividad total se evalúa como el sumatorio de las interrupciones de los haces emitidos por las 16 células. La medición de la actividad motora se realizó mediante el programa informático Actim 16X (Cibertec, S.A.).

Los bastidores se colocan por fuera de las jaulas de microdiálisis una vez colocado el animal en el sistema de perfusión. Tras las 3 horas de estabilización, se contabiliza la actividad motora cada 30 minutos durante un periodo de 24 horas, de manera paralela a la recogida de muestras de la perfusión intracerebral (Marquez de Prado et al., 2003).

3.4. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS Y MONOAMINAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

De las muestras recogidas en los experimentos de perfusión se separaron dos alícuotas antes de ser almacenadas a -80°C : una alícuota de 5 μl para el análisis de aminoácidos; y otra de 25 μl para el análisis de monoaminas. En los experimentos en los que se mide también acetilcolina se separa una tercera alícuota de 10 μl para el análisis de este neurotransmisor y de su metabolito, colina.

3.4.1. Detección de aminoácidos como OPA-derivados

Los aminoácidos se analizan por HPLC de fase reversa acoplado a un detector fluorométrico según el método desarrollado previamente en el laboratorio (Segovia et al., 1997; Del Arco et al., 1998; Del Arco et al., 1999). Se realiza una derivación precolumna con el reactivo o-ftaldialdehído-3-mercaptopropiónico (OPA-3-mercaptopropiónico) (Lerma et al., 1986). El material necesario para la preparación del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico es el siguiente:

- O-ftaldialdehído (OPA) (Sigma),
- ácido 3-mercaptopropiónico (Sigma),
- borato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (Merck),
- metanol grado HPLC (Scharlau).

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

La derivación precolumna de los aminoácidos se realizada de la siguiente manera. A una alícuota de muestra de 5 μl se le incorporan 5 μl de estándar interno (homoserina 6.25 μM). Posteriormente se añaden 10 μl del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico. La mezcla resultante, se agita en un vórtex durante 15 segundos para favorecer la reacción. Transcurrido 1 minuto desde la adición del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico a la muestra se añaden 5 μl de ácido acético al 5% con el fin de disminuir el pH de la mezcla y evitar la pérdida de sílice de la columna.

Finalizada la derivación, se inyectan en el cromatógrafo 20 μl de la solución obtenida mediante un inyector tipo Rheodyne de volumen fijo de 20 μl . La muestra pasa por una precolumna C18 Spherisorb® (Phase separations) y después por una columna Spherisorb® ODS-2 (Phase separations) con un tamaño de partícula de 5 μm , un diámetro de 4.6 mm y una longitud de 15 cm.

Condiciones cromatográficas

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

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

- 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 μm ;
- alcohol isopropílico grado HPLC (Scharlau);
- metanol grado HPLC (Scharlau);
- tampón acetato sódico 4 M (Pierce);
- NaOH en lentes (Merck);
- ácido acético (Merk).

La fase móvil A consiste en una solución 95/5 (v/v) de tampón acetato sódico 50 mM y metanol, a la que se le añaden 12.5 ml de alcohol isopropílico por cada litro de mezcla. El tampón acetato sódico utilizado en la fase móvil A se prepara a partir de una solución de acetato sódico 4 M con pH ajustado a 5.67 y filtrada a través de un filtro Millipore de 0.45 μm . La fase móvil B consiste en una mezcla 70/30 (v/v) de metanol y agua.

Previamente a su utilización, ambas soluciones se introducen en un baño de sonicación durante 15 min para su degasificación y durante el proceso de análisis el flujo de helio fue de 10 ml/min .

El programa de gradientes empleado es el siguiente, los 16 primeros minutos son el tiempo de análisis de la muestra y los 4 minutos siguientes permiten restablecer las condiciones de inicio:

PROGRAMA DE GRADIENTES			
Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0.00	1.00	90	10
9.00	1.00	52	48
12.00	1.00	0	100
16.00	1.00	0	100
16.01	1.00	90	10
20.00	1.00	90	10

La detección de los aminoácidos OPA-derivados se realiza con un detector de fluorescencia Waters 474 con un filtro de excitación de 340 nm y un filtro de emisión de 460 nm.

La figura 15 muestra un ejemplo de cromatogramas (patrón y muestra) obtenidos con las condiciones cromatográficas descritas.

La recogida y procesamiento de los datos cromatográficos y la cuantificación de las concentraciones de los aminoácidos se lleva a cabo mediante el programa informático MAXIMA (Waters) siguiendo el método del estándar interno. El estándar interno empleado es homoserina (Peinado et al., 1986).

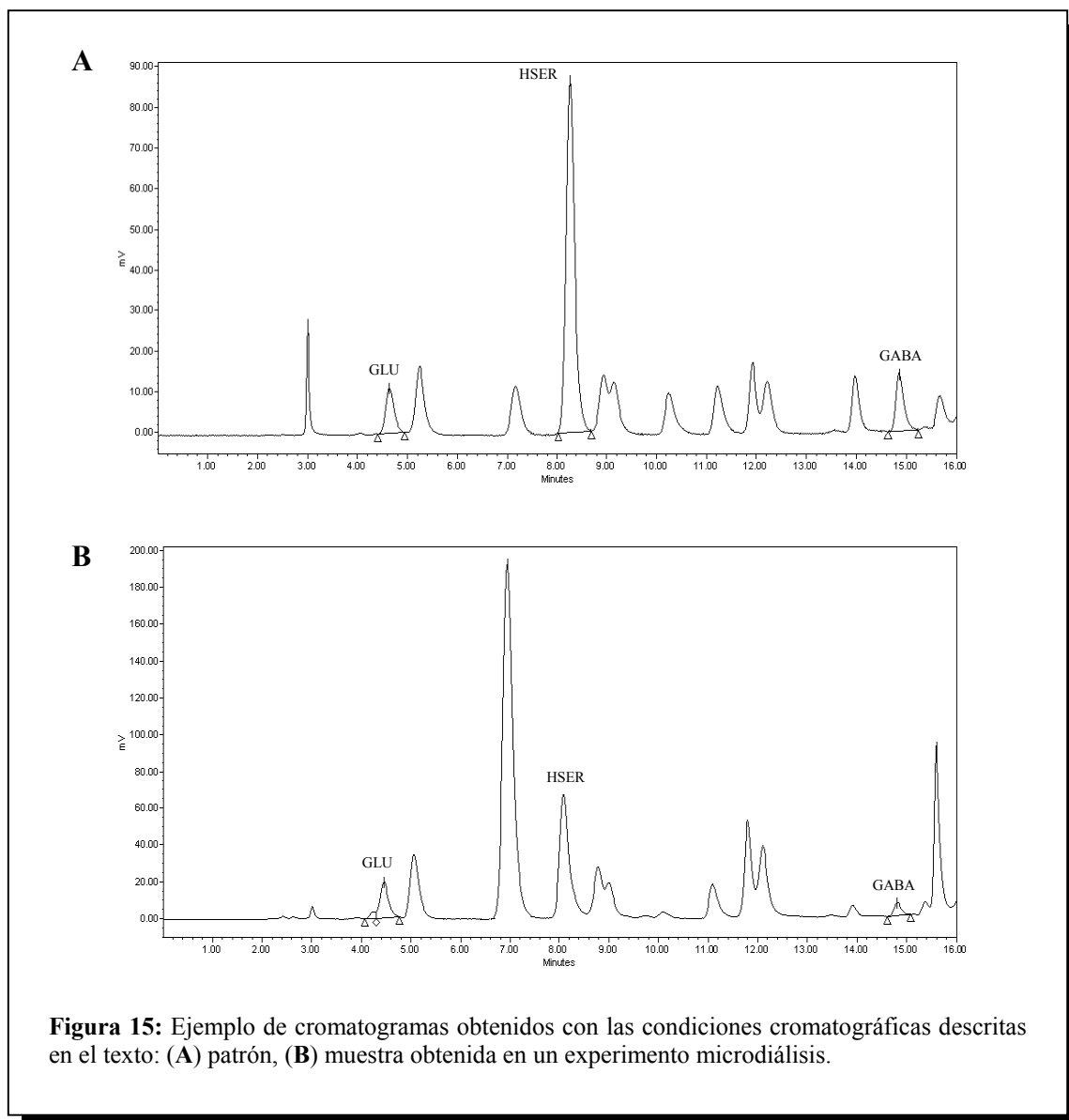


Figura 15: Ejemplo de cromatogramas obtenidos con las condiciones cromatográficas descritas en el texto: (A) patrón, (B) muestra obtenida en un experimento microdiálisis.

Factor de dilución

El hecho de realizar una derivación precolumna de la muestra o de la solución patrón obliga a calcular el factor de dilución o volumen de muestra que se encuentra en la mezcla inyectada. La preparación de la muestra, mencionada en el apartado 3.3.1. de este capítulo, se hace añadiendo a los 5 μ l de muestra o solución patrón 5 μ l de estándar interno, 10 μ l de OPA-3-mercaptopropiónico y 5 μ l de ácido acético al 5%. El volumen final de la mezcla es, por tanto, de 25 μ l. De estos 25 μ l se inyectan 20 μ l en el cromatógrafo.

El volumen total de muestra inyectado es, por tanto, de 4 μ l. El factor de dilución se calcula hallando el cociente entre el volumen total de muestra inyectado y el volumen final inyectado, es de $4/20 = 0.2$. La concentración de cada aminoácido presente en la muestra se calcula dividiendo la cantidad medida de dicho aminoácido por el factor de dilución 0.2.

Calibración

La calibración se realiza con el fin de obtener los valores de referencia de los tiempos de retención, así como la recta de calibración 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 programa informático MAXIMA para identificarla. La recta de calibración para cada sustancia relaciona las concentraciones conocidas de esta sustancia con las áreas de los picos cromatográficos (la proporción entre las áreas de la sustancia analizada y del estándar interno).

Para la calibración del cromatógrafo, se preparan soluciones patrón de cada uno de los aminoácidos analizados a partir de las soluciones madre. La calibración se realiza inyectando en el cromatógrafo patrones a concentraciones diferentes (0.25, 0.5, 1, 5, 10 y 20 μ M). El límite de detección fue de 0.05 μ M para todos los aminoácidos.

Cálculo del coeficiente de variación

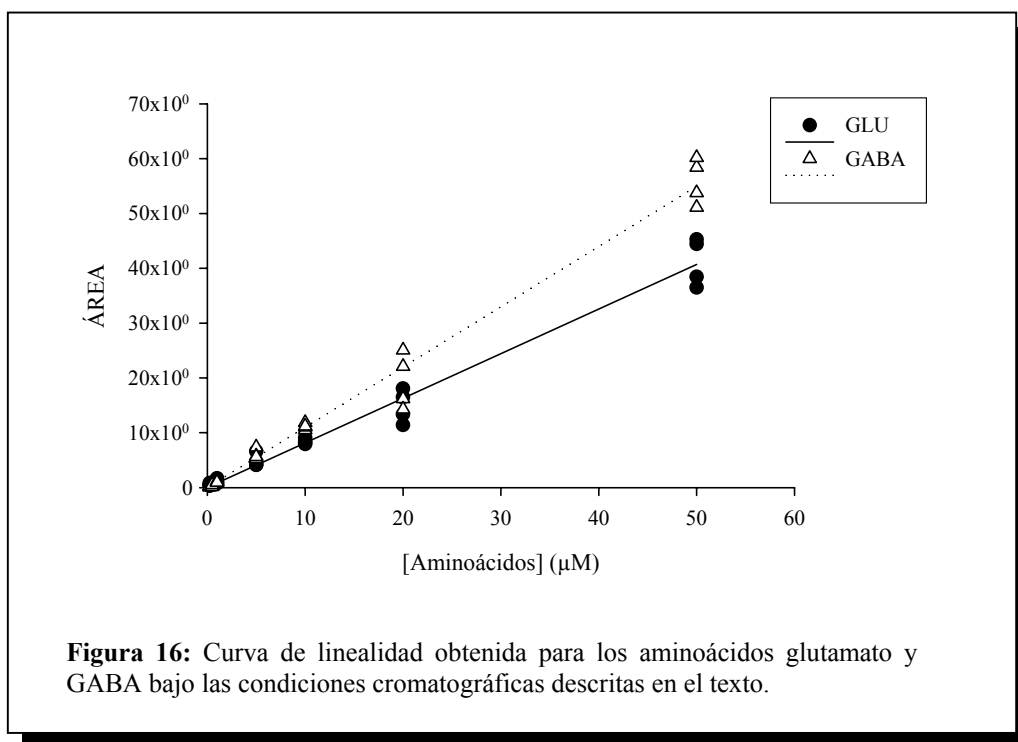
Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo 6 alícuotas de una solución patrón con concentraciones de 1 μ M para cada aminoácido. Puesto que estas inyecciones se realizaron por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas son reflejo de la variabilidad propia del método.

El coeficiente de variación (CV) obtenido para cada aminoácido (GABA, GLU-glutamato) puede observarse en la siguiente tabla:

COEFICIENTE DE VARIACIÓN				
	n	MEDIA (μ M)	S	CV (%)
GLU	6	1.256	0.075	5.272
GABA	6	1.199	0.108	9.018

Linealidad del análisis cromatográfico

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico descrito se inyectan en el cromatógrafo soluciones patrón con 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 se ajusta a una línea recta (figura 16).



3.4.2. Detección de monoaminas por HPLC

Las monoaminas presentes en las muestras recogidas en el tejido cerebral *in vivo* se analizan mediante HPLC de fase reversa acoplado a un detector electroquímico según el método previamente usado en nuestro laboratorio (Segovia y Mora, 1998).

La muestra se inyecta en un inyector Rheodyne (loop de 25 μl), pasada primero a través de una precolumna C18 Nova-Pack® (Waters) con un tamaño de partícula de 4 μm, un diámetro de 3.9 mm y una longitud de 20 mm; posteriormente la muestra corre a través de una columna Nova-Pack® (Waters) con un tamaño de partícula de 4 μm y unas dimensiones de 3.9x150 mm.

Condiciones cromatográficas

Para la separación de monoaminas se utiliza un programa isocrático, con un flujo constante de 1 ml/min y una sola fase móvil, lo cual permite la detección de la dopamina, sus metabolitos y el metabolito de serotonina en 5 minutos. Para preparar la fase móvil se requieren los siguientes compuestos:

- metanol grado HPLC (Scharlau);
- acetato sódico (Merck);
- ácido cítrico (Merk);
- sulfonato sódico (Scharlau);
- etilenediamina-tetraacético (EDTA) (Sigma).

La fase móvil consiste en una solución 82/18 (v/v) de tampón acetato citrato 0.1 M y metanol. El tampón acetato citrato se prepara disolviendo en agua bidestilada acetato sódico y ácido cítrico al que se añade sulfonato sódico 2.9mM y EDTA 1 Mm (pH= 3.48, ajustado con HCl 1 N). Posteriormente, el tampón se filtra (filtro 0.45 mm, Millipore). Previamente a su utilización, la fase móvil se introduce en un baño de sonicación durante 15 minutos para su degasificación.

La detección de las monoaminas se realiza mediante un detector electroquímico Coulochem II 5200^a (ESA): éste consta de una célula de guarda (ESA 5021), fijada a 50 mV, y dos células analíticas (5011), fijadas a 340 mV (célula 1 o de oxidación) con una sensibilidad de 2 μ A, y a -250 mV (célula 2 o de reducción) con una sensibilidad de 5 nA. Se utilizan dos células analíticas debido a la diferencia de concentraciones entre la dopamina (rango de nM) y sus metabolitos y el de la serotonina (rango de μ M), lo que complicaría su detección con una sola célula. La figura 17 muestra un ejemplo de cromatograma (patrón y muestra) obtenidos bajo las condiciones cromatográficas descritas.

Los datos cromatográficos se procesan usando el programa informático MAXIMA[®] (Waters).

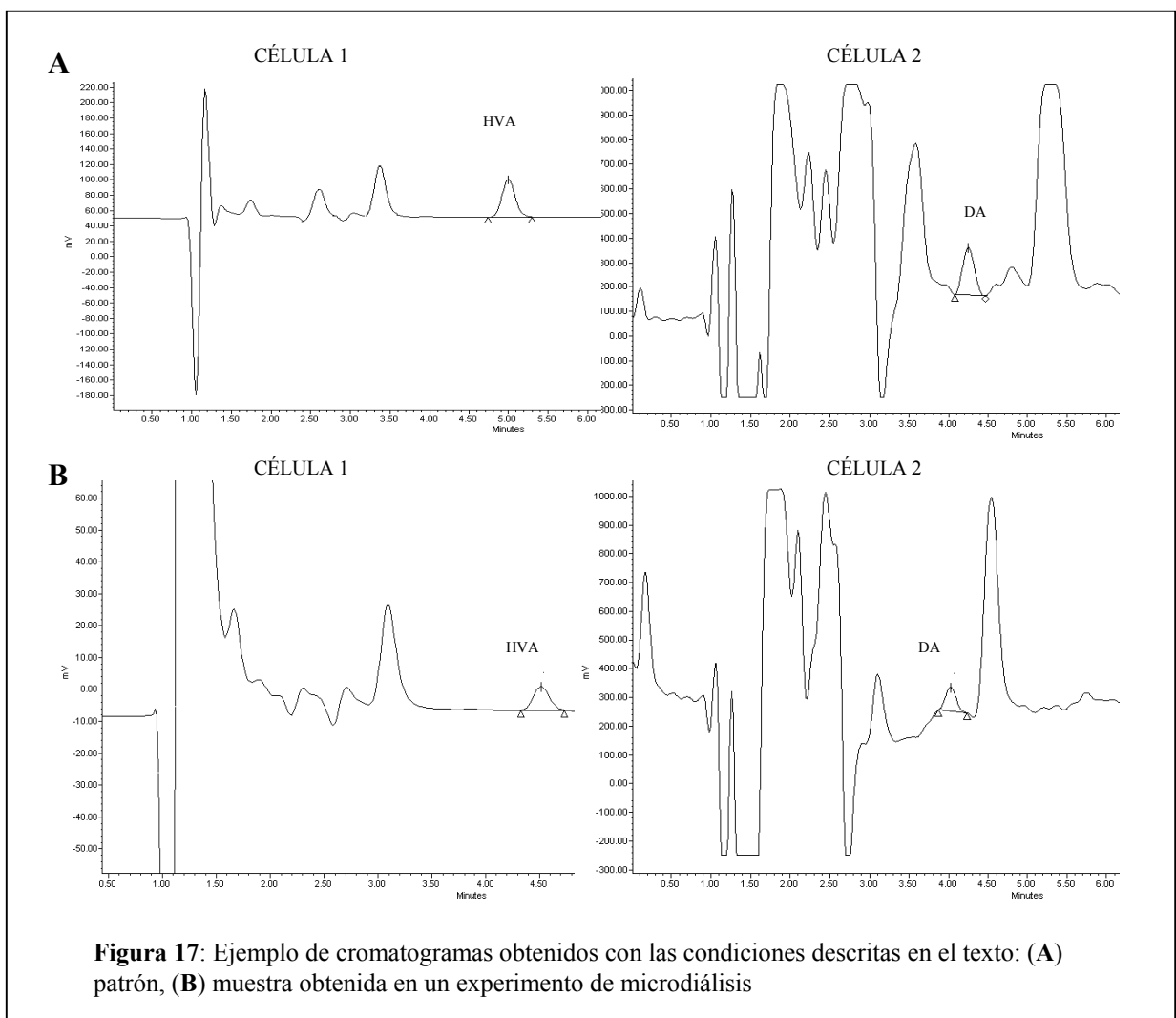


Figura 17: Ejemplo de cromatogramas obtenidos con las condiciones descritas en el texto: (A) patrón, (B) muestra obtenida en un experimento de microdialísis

Calibración

La calibración se realiza con el fin de proporcionar al programa los valores de referencia de los tiempos de retención, así como los factores de respuesta de cada amina analizada. 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 programa informático para identificarla. El factor de respuesta de cada sustancia pone en relación las concentraciones conocidas de esta sustancia con las áreas de los picos cromatográficos.

Para la calibración del cromatógrafo, se prepararan soluciones patrón con cada una de las monoaminas analizadas a partir de las soluciones madre. La calibración se realiza inyectando en el cromatógrafo patrones con diferentes concentraciones de dopamina (0.5, 1, 2 y 4 nM) y del HVA (100, 200, 400, 800 nM). El límite de detección fue de 0.1 nM para dopamina y 10 nM para HVA.

Cálculo del coeficiente de variación

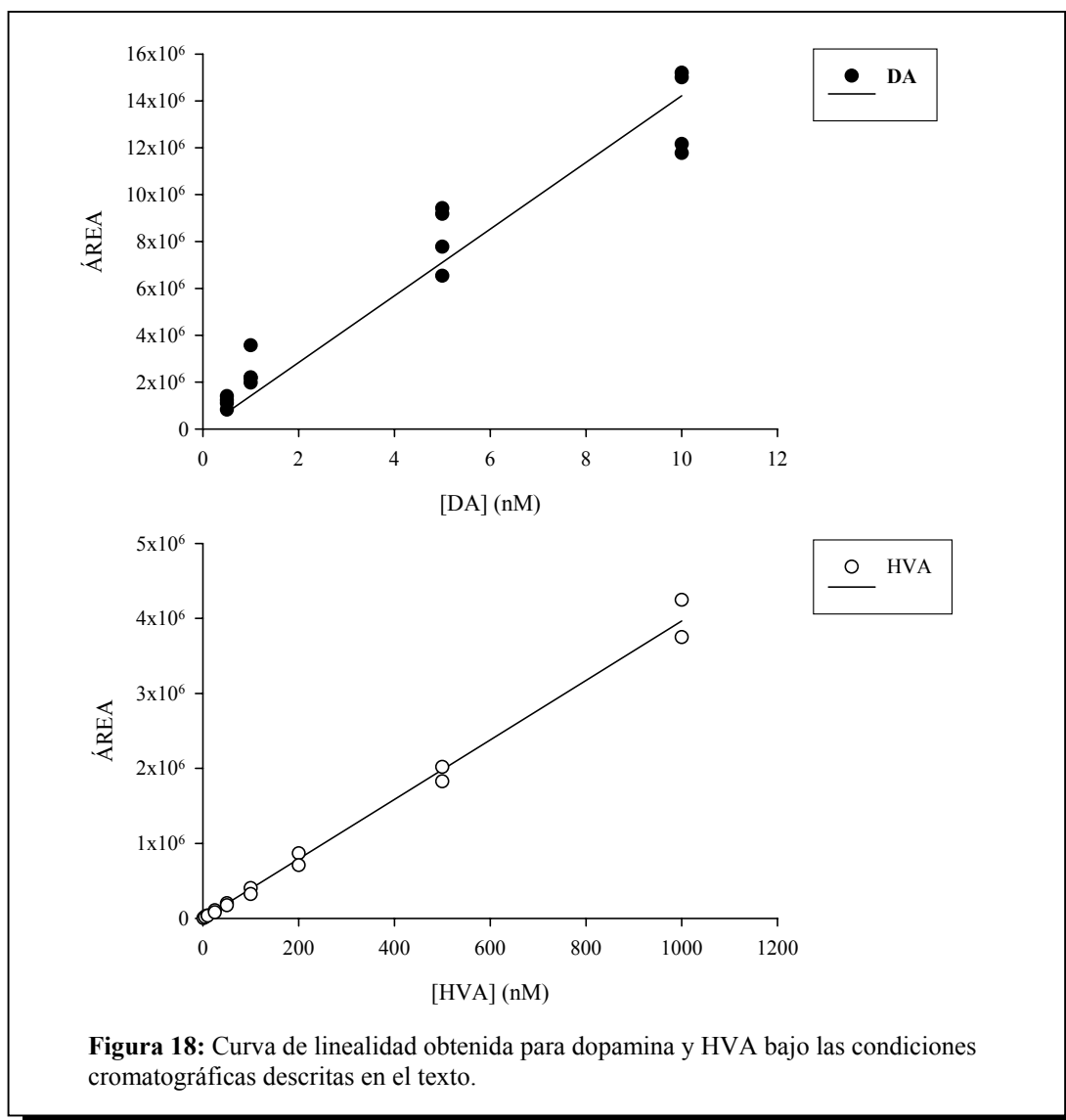
Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo seis alícuotas de una solución patrón de 1 nM de dopamina y 140 nM de HVA. Puesto que estas inyecciones son realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método.

Los coeficientes de variación (CV) obtenidos para cada amina (DA-dopamina) se expresan en la siguiente tabla.

COEFICIENTE DE VARIACIÓN				
	n	MEDIA (nM)	S	CV (%)
DA	6	0.98	0.11	11.59
HVA	6	66.44	4.76	7.17

Linealidad del análisis cromatográfico

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico utilizado se inyectan en el cromatógrafo soluciones patrón con concentraciones variables de las monoaminas a analizar. La representación gráfica de la relación entre el área bajo la curva de cada amina (eje de ordenadas) y la concentración inyectada (eje de abcisas) se ajusta a una línea recta (Figura 18).



3.4.3. Detección de acetilcolina

El contenido de acetilcolina presente en las muestras recogidas en el tejido cerebral *in vivo* se analizó mediante HPLC de fase reversa acoplado a un detector electroquímico.

Condiciones cromatográficas

Se utilizó un sistema de bombeo isocrático y un autoinyector (seri HP 1100, Hewlett-Packard). La fase móvil, bombeada a un flujo constante de 0.15 ml/min, consistió en un tampón fosfato cuya composición es la siguiente:

- Agua ultrapura (sistema de purificación Milli-Q Plus®, Millipore);
- Sodio di-hidrógeno fosfato (Panreac Química S.A.) 50 mM;
- Etilenediamina-tetraacético (EDTA) (Sigma) 0.5 mM.

Con el fin de evitar el sobrecrecimiento bacteriano en el sistema cromatográfico, se añade un bacteriostático ProClin® 150 Reagent (BAS), 5 ml por litro de tampón. Por último, se ajusta el pH de la solución a 8.5 con hidróxido de sodio puro en lentejas (Merck).

Antes de pasarla por el sistema de cromatografía, la fase móvil filtrada (filtros GSWP4700, poro 22 μm , Millopore) y sonicada 15 minutos para su degasificación. Tras su inyección, la muestra corre a través de una columna microbore (UniJet microbore ACh/CH analytical column, BAS) de dimensiones 530 x 1 mm y tamaño de partícula 10 μm .

Con estas condiciones cromatográficas el tiempo de retención de la acetilcolina fue de 6.5 minutos.

A continuación de la columna se dispone el reactor enzimático (UniJet microbore ACh/CHO IMER, BAS) de dimensiones 50 x 1 mm y tamaño de partícula 10 μm , en cuyo interior se produce la hidrólisis de la acetilcolina por acción de las enzimas acetilcolinesterasa dando lugar a peróxido de hidrógeno y betaína. El peróxido de hidrógeno es oxidado electroquímicamente por un electrodo de platino (BAS), fijado a un potencial de +500mV vs Ag/AgCl, alojado en el interior de un detector programable (modelo HP1049A, Hewlett-Packard).

Los datos cromatográficos fueron procesados mediante el *software* informático HPChemStation (Hewlett-Packard). La figura 19 muestra un ejemplo de cromatogramas correspondientes a un patrón y a una muestra problema, obtenidos bajos las condiciones descritas.

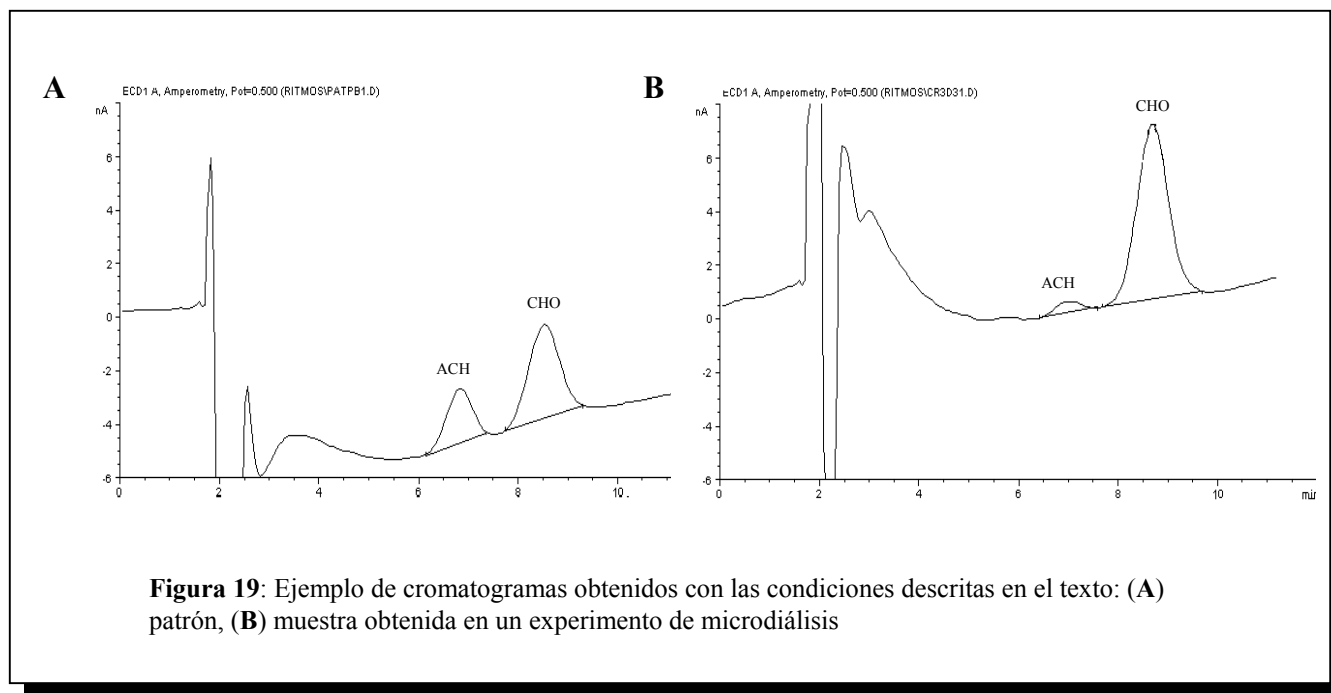


Figura 19: Ejemplo de cromatogramas obtenidos con las condiciones descritas en el texto: (A) patrón, (B) muestra obtenida en un experimento de microdiálisis

Calibración

La calibración se realiza con el fin de proporcionar al programa los valores de referencia de los tiempos de retención, así como los factores de respuesta de cada amina analizada. 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 programa informático para identificarla. El factor de respuesta de cada sustancia pone en relación las concentraciones conocidas de esta sustancia con las áreas de los picos cromatográficos.

Para la calibración del cromatógrafo, se prepararan soluciones patrón con cada una de las monoaminas analizadas a partir de las soluciones madre. La calibración se realiza inyectando en el cromatógrafo patrones con diferentes concentraciones de acetilcolina (10, 25, 50, 100, 200, 500 nM). El límite de detección para la acetilcolina bajo las condiciones cromatográficas descritas fue de 5 nM.

Cálculo del coeficiente de variación

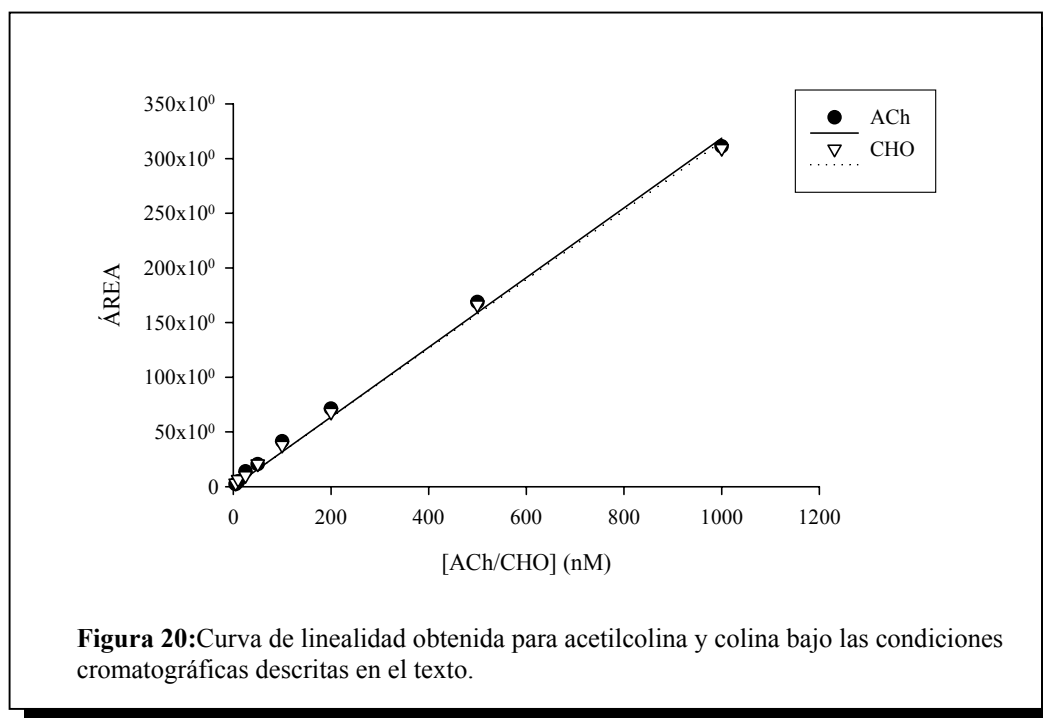
Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo seis alícuotas de una solución patrón de 50 nM de acetilcolina. Puesto que estas inyecciones son realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método.

El coeficiente de variación (CV) obtenido para la acetilcolina (ACh) se expresan en la siguiente tabla.

COEFICIENTE DE VARIACIÓN				
	n	MEDIA (nM)	S	CV (%)
ACh	6	56	3.97	7.05

Linealidad del análisis cromatográfico

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico utilizado se inyectan en el cromatógrafo soluciones patrón con concentraciones variables de acetilcolina. La representación gráfica de la relación entre el área bajo la curva de cada amina (eje de ordenadas) y la concentración inyectada (eje de abcisas) se ajusta a una línea recta (Figura 20).



3.6. HISTOLOGÍA

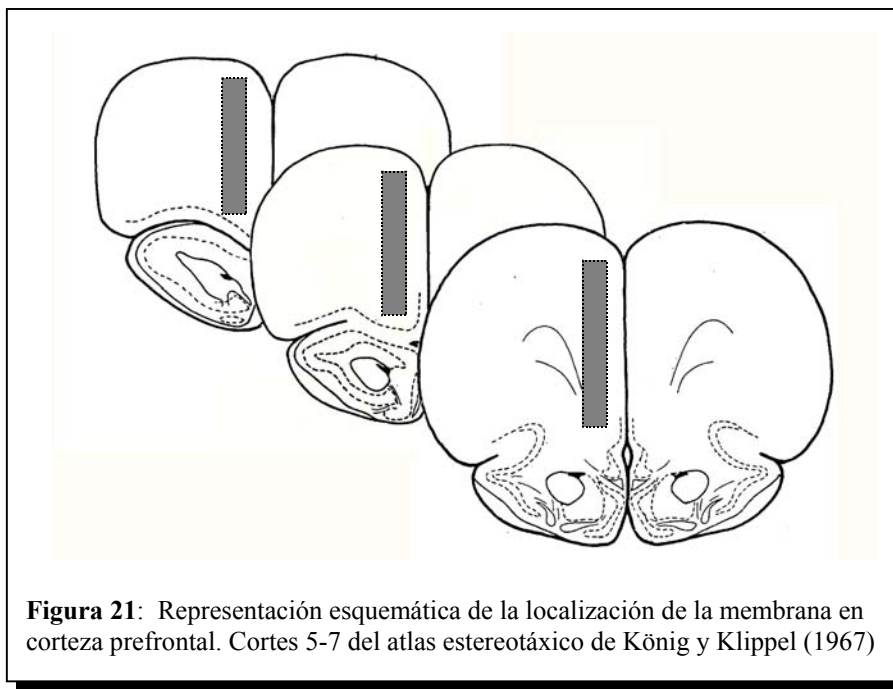
Una vez finalizados los experimentos, se comprobó la correcta localización de las cánulas de diálisis mediante el estudio histológico de las piezas cerebrales.

El material empleado para el estudio histológico de las piezas fue el siguiente:

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

El animal se anestesia con Equithesin (2 ml/kg i.p.). A continuación se realiza una perfusión intracardiaca con solución salina isotónica (NaCl 0.9%) heparinizada al 1%, seguida de una solución de formaldehído al 10%. Una vez fijado el tejido, se extrae el cerebro y se mantiene en una solución de formaldehído al 10% a 4 °C.

Antes de colocarla en el microtomo la pieza se lava con agua abundante para eliminar el formaldehído. Se obtienen muestras de 50 µm de espesor que se colocan bajo la lupa binocular para comprobar la localización de la cánula en el área estudiada.



4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se estudian los ritmos circadianos de las variables mediante el método Cosinor (Díez-Noguera y Cambras, 1989; Cugini, 1991). El método Cosinor aproxima la siguiente fórmula sinusoidal a los datos experimentales:

$$Y_t = M + A * \cos\left(\frac{2\pi}{TAU} * t + \phi\right)$$

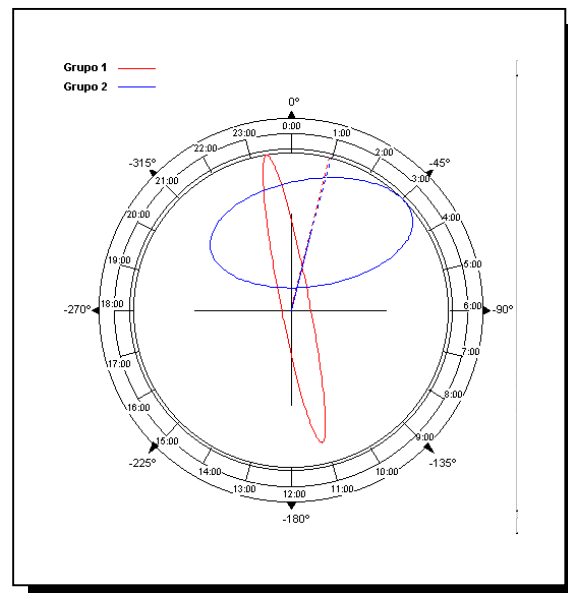
donde M es el mesor, A la amplitud, TAU el periodo que en el caso de los ritmos circadianos $TAU= 24$, t es una fracción temporal del ciclo y ϕ es la acrofase. El método Cosinor cuantifica la onda sinusoidal que más se ajusta a los datos experimentales en tres parámetros: mesor, amplitud y acrofase (Cugini, 1991).

Para aplicar el método Cosinor utilizamos un programa informático denominado “ritmon”. Este programa informático nos proporciona los valores de mesor, amplitud y acrofase de la senoide que mejor se ajusta a cada uno de los individuos del grupo de estudio, así como el grado de significación del ajuste representado por el valor de la “p”. También nos proporciona valor del mesor, amplitud y acrofase para la senoide que más se ajustaría al grupo de individuos en conjunto y calcula la región de confianza del 95% para la acrofase y amplitud del ritmo circadiano, dando el resultado de la “p”. El programa también proporciona una salida gráfica que representa esta región de confianza en un sistema de ejes horarios de 24 horas, equiparando el periodo del ritmo a una circunferencia. En este sistema se marca un vector que va desde el centro de los ejes hasta un punto de la circunferencia. La longitud del vector marca la amplitud estimada del ritmo, y el ángulo que forma el vector con la vertical la acrofase. La región de confianza consiste en una serie de puntos alrededor del vector estimado

que marca las posibles localizaciones del verdadero vector de la población con una confianza del 95%. Sobre esta región podemos observar:

- 4.1. Si la región de confianza NO incluye el punto central del círculo horario (Ejemplo1: Grupo 2 -azul podemos aceptar que el grupo de individuos Sí tiene ritmo circadiano y su amplitud y acrofase estarían dentro de la región de confianza. En la salida numérica dl programa la “p” para el ajuste poblacional esta senoide sería menor de 0.05
- 4.2. Si la región de confianza INCLUYE el punto central del círculo horario NO hay significación estadística para asegurar el ritmo circadiano de la población (Ejemplo 1: Grupo1-rojo). En la salida numérica del programa, la “p” para el ajuste a la sinusoidal de la población sería mayor de 0.05.

Ejemplo 1:



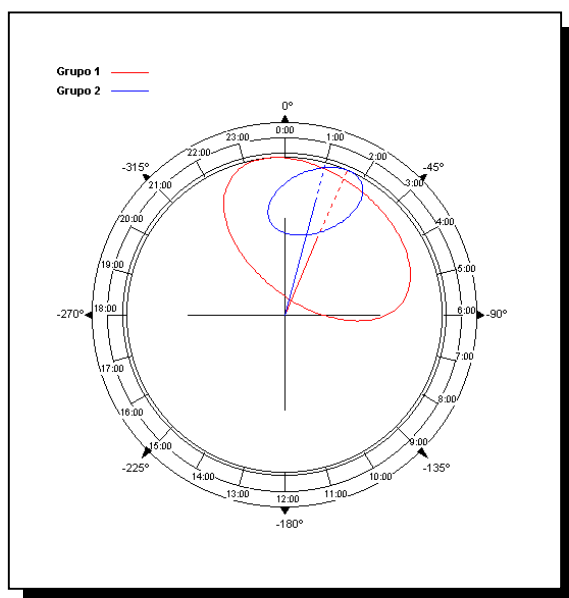
4.1. En el caso en que se ajusta a poblacionalmente a una sinusoidal (ejemplo1: Grupo1-azul) el programa da la amplitud, mesor y acrofase de la senoide que más se ajusta a los datos, y que por tanto es la amplitud, mesor y acrofase de nuestro ritmo circadiano. El mesor y la amplitud viene dada en las unidades de nuestra variable, en concentración para los neurotransmisores y en nº de cortes de haz para la actividad motora. La acrofase viene dada en radianes, ya hemos visto antes que el programa equipara el ciclo de 24 horas a una circunferencia. Realizamos las siguientes transformaciones en los resultados proporcionados por el programa:

- La amplitud la expresamos en tanto por ciento de los valores basales para dar una idea de la variación y que sea comparable a los resultados del apartado 4.2. Los valores basales se calculan como la media de las cuatro primeras horas del experimento (sin contar con las tres horas de estabilización).
- La acrofase la expresamos en horas, minutos y segundos de la siguiente manera: Como hemos visto antes el programa equipara un ciclo de 24 horas a una circunferencia, luego 24 horas=360° y 360°= 2π radianes; así que 24 horas= 2π radianes:

$$X \text{ horas} = \frac{Y \text{ radianes}}{\left(\frac{2\pi}{24}\right)}$$

Si los dos grupos que estamos comparando se ajustan poblacionalmente a una sinusoidal, es decir, sus regiones de confianza no incluyen el centro de la circunferencia, el programa realiza un test de comparación entre mesores de los dos grupos de tal modo que si el resultado de este test nos da una $p < 0.05$ podemos decir que sus mesores son distintos. También realiza un test conjunto que compara la amplitud y acrofases. El programa proporciona el valor de la “p” para estos test, siendo significativa si $p < 0.05$. Gráficamente, esta comparación se realiza viendo si las regiones de confianza de los dos vectores correspondientes a los dos grupos se solapan. Si estas regiones tienen puntos en común no se puede concluir que los ritmos circadianos sean distintos. Vemos un ejemplo (ejemplo 2) de dos grupos que no son distintos en ninguno de los parámetros, ya que gráficamente se visualizan las regiones de confianza superpuestas y los valores de los test son no significativos.

Ejemplo: 2



COMPARACIÓN AMBOS GRUPOS
Test Mesor 0.5552
Test Amplitud-Acrofase 0.8232

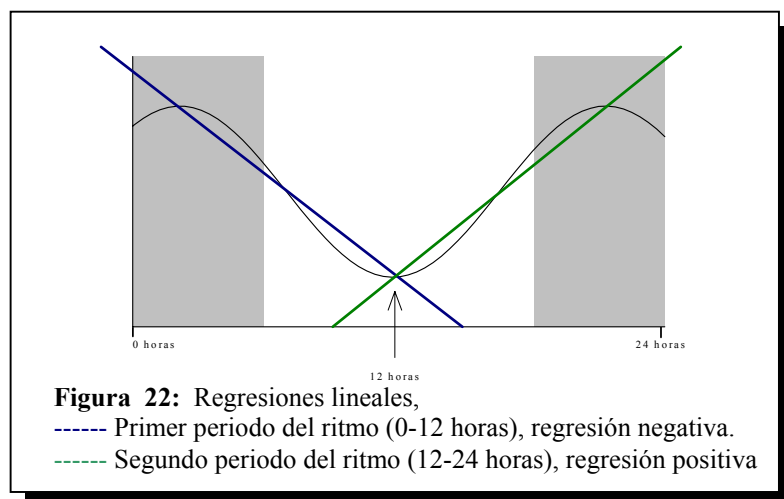
Si por el contrario las regiones de confianza no se solapan podemos decir que los ritmos circadianos de las poblaciones de donde se han muestreado estos grupos son distintos en amplitud, acrofase o ambos. En el ejemplo 3 vemos la salida numérica de una comparación entre dos grupos en la que el test conjunto de amplitud-acrofase es significativo:

Ejemplo 3 :

COMPARACIÓN AMBOS GRUPOS	
Test Mesor	0.478
Test Amplitud-Acrofase	1.237e-002

En este caso no hay diferencias significativas en el mesor, pero el test conjunto para la amplitud y acrofase es significativo. No podemos saber a cuál de los dos parámetros del ritmo se debe la significación. Aunque, si los niveles de la variable fueran diferentes en un determinado periodo del ciclo, nos sugerirían una posible diferencia debida a la amplitud y unos distintos perfiles de las gráficas temporales sugerirían una posible diferencia debida a la acrofase.

4.2. Cuando los resultados no se ajustan poblacionalmente a una sinusoidal, (ejemplo 1: grupo 2-rojo). Hay variables para las que, aunque el análisis poblacional no mostraba un ajuste a una sinusoidal, gran parte de los individuos al analizarlos estadísticamente uno por uno se ajustaban a una sinusoidal. Los ritmos circadianos presentan una variabilidad interindividual en sus amplitudes, que pueden hacer que aunque todos los individuos varíen según un ritmo circadiano, no se ajusten poblacionalmente a una sinusoidal (Castañeda et al., 2004). Para analizar estos casos estadísticamente y no entrar a valorar si el hecho de que los individuos por separado se ajusten implica o no la existencia de un ritmo circadiano, analizamos los cambios de las concentraciones extracelulares en las transiciones oscuridad-luz y luz-oscuridad usando una ANOVA de medidas repetidas seguida de un análisis de regresión lineal (Martín y Luna, 1990) (ver figura 22). Consideramos que existe un ritmo circadiano en la variación de las concentraciones extracelulares cuando se produce un descenso significativo en la transición oscuridad-luz y un aumento significativo en la transición luz-oscuridad y viceversa.



Si una variable no se ajusta poblacionalmente a una sinusoidal y no muestra regresiones significativas de signos contrarios en los dos cambios de periodo del ciclo, no consideramos que varíe según un ritmo circadiano.

Resultados

Bloque Experimental 1

Estudio de los ritmos circadianos de neurotransmisores en Corteza Prefrontal y de actividad motora de la rata despierta.

I. Introducción

La corteza prefrontal está implicada en funciones como la memoria de trabajo, la atención selectiva, la flexibilidad comportamental y la regulación del estado de ánimo. Algunas de estas funciones están sujetas a variaciones circadianas. Por ejemplo la memoria de trabajo (Monk et al., 1997; Wright et al., 2002), el estado de ánimo (Owens et al., 2000; Adan y Sánchez-Turet, 2001) o la atención (Kraemer et al. 2000) muestran un patrón circadiano. Además la alteración del patrón circadiano afecta a la memoria a corto plazo, la atención (Cho et al., 2000) y el estado de ánimo (Florida-James et al., 1996). Todo esto sugiere la existencia de un mecanismo circadiano subyacente que afectaría a estas funciones de la corteza prefrontal. De hecho se ha descrito una vía multisináptica que conecta al núcleo supraquiasmático (el principal reloj endógeno) con la corteza prefrontal vía núcleo paraventricular del tálamo (Sylvester et al., 2002).

Sin embargo, poco se sabe de los ritmos circadianos de los principales sistemas de neurotransmisores que codifican dichas funciones de la corteza prefrontal.

La corteza prefrontal medial recibe aferencias dopaminérgicas desde núcleos mesencefálicos, específicamente desde área tegmental ventral y glutamatérgicas desde distintas áreas de corteza. También esta área contiene interneuronas GABAérgicas. En la corteza prefrontal, la mayoría de las neuronas son glutamatérgicas, así como también las neuronas de proyección hacia otras áreas de corteza o subcorticales. Todo esto hace que esta estructura cerebral sea un sustrato importante a la hora de estudiar las variaciones de las concentraciones extracelulares de estos neurotransmisores en áreas del sistema nervioso central fuera del núcleo supraquiasmático.

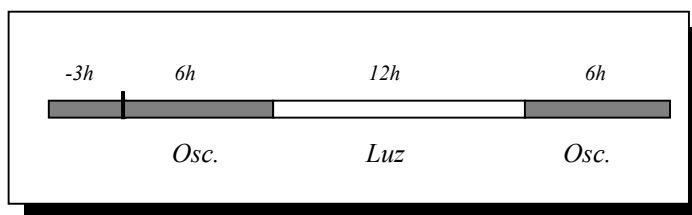
No hemos encontrado referencias en la literatura científica acerca de la relación entre los ritmos circadianos y glutamato y GABA en corteza prefrontal. Sí hay por el contrario algunos trabajos mostrando un ritmo circadiano en las concentraciones extracelulares de dopamina en la corteza prefrontal (Nakayama et al., 1993; Feenstra et al, 2000).

El objetivo de este primer bloque experimental fue el estudio de los ritmos circadianos de glutamato, GABA y dopamina en la corteza prefrontal. También medimos las concentraciones extracelulares de HVA y los niveles simultáneos de actividad motora de los animales.

II. Material y Métodos

En este bloque experimental se utilizaron ratas de 2-4 meses de edad, mantenidas en un ciclo 12h oscuridad/12h luz y temperatura constante de 24° C. 10-15 días tras la implantación estereotáxica de las cánulas guía se llevaron a cabo los experimentos de microdiálisis en la rata despierta utilizando LCRs a un flujo de 1,25 μ l/min. Al líquido cefalorraquídeo sintético se añadió 5 μ M de nomifensina (RBI, Research Biochemicals International) con el objetivo de incrementar los niveles de dopamina endógena y así detectar y cuantificar con más precisión los niveles basales de dopamina (Santiago et al., 1993) Tras tres horas de estabilización se recogieron muestras cada 30 minutos durante 24 horas (2 p.m. a 2 p.m. del día siguiente) bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz

Protocolo de experimento:



Para la detección de glutamato y GABA se separaron 5 μl de las muestras que se analizaron mediante HPLC acoplado a un sistema de detección fluorométrica, y para la detección de dopamina y HVA 25 μl que se analizaron mediante HPLC acoplado a una sistema de detección electroquímica. Los datos cromatográficos se procesaron usando el programa informático MAXIMA® (Waters). Las concentraciones basales se calcularon como la media de las concentraciones de las 4 primeras horas de microdiálisis.

A final de los experimentos se realizó un examen histológico para comprobar la correcta localización de la cánula de microdiálisis.

Las concentraciones obtenidas se analizaron estadísticamente a través de método de Cosinor y/o un ANOVA seguida de un análisis de regresión (ver material y métodos generales en esta misma tesis).

III. Resultados

Los resultados se presentan en gráficas de valores absolutos de concentración (μM para glutamato y GABA, nM dopamina y HVA) y de niveles de actividad motora (nº de cortes de haz). Y en tablas con los parámetros de los ritmos circadianos en caso de que se ajusten a un modelo sinusoidal.

Las concentraciones extracelulares basales en la corteza prefrontal fueron: Glutamato = $2,45 \pm 0,76 \mu\text{M}$; GABA = $0,21 \pm 0,04 \mu\text{M}$; dopamina = $0,27 \pm 0,10 \text{ nM}$; HVA = $39,42 \pm 8,00 \text{ nM}$. Los niveles basales de actividad motora fueron $1012,77 \pm 64,35$ nº de cortes de haz.

Las concentraciones extracelulares de **glutamato** en la corteza prefrontal no se ajustaron poblacionalmente a un modelo sinusoidal aunque 6 de los 6 animales estudiados sí mostraron un ritmo circadiano que se ajustó a dicho modelo. Por otro lado, se produjo una disminución de un 48,98% ($1,25 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales ($2,45 \pm 0,76 \mu\text{M}$) en relación a las concentraciones extracelulares de glutamato en el cambio al periodo de luz ($n=6$; $p<0,05$) y aumentaron durante el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 135% ($3,31 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales ($n=6$; $p<0,001$) (Figura 1-A). Las concentraciones extracelulares de glutamato mostraron un ritmo circadiano siendo sus niveles más altos durante la fase de oscuridad.

Las concentraciones extracelulares de **GABA** en la corteza prefrontal no mostraron un ritmo circadiano que se ajuste a un modelo sinusoidal aunque 5 de los 6 animales estudiados mostraron ritmo circadiano de GABA que si se ajustó a dicho modelo ($n=6$) (Figura 1-B). Sin embargo, aunque las concentraciones extracelulares de GABA disminuyeron un 47,62% ($0,11$

μM) de las concentraciones basales ($0,21\pm 0,004 \mu\text{M}$) con el paso al periodo de luz ($n=6$, $p<0,001$), sus concentraciones no aumentaron en el segundo periodo de oscuridad ($n=6$, $p>0,05$). Las concentraciones extracelulares de GABA no mostraron un ritmo circadiano.

Las concentraciones extracelulares de **dopamina** no mostraron un ritmo circadiano en la corteza prefrontal de la rata, ya que no se ajustan poblacionalmente a un modelo sinusoidal y no muestran disminuciones ni aumentos con los cambios del ciclo oscuridad/luz ($n=5$) (Figura-C).

Su principal metabolito **HVA** no se ajustó poblacionalmente a un modelo sinusoidal aunque 4 de los 6 animales estudiados mostraron un ritmo circadiano de HVA que sí se ajustó a dicho modelo. Por otro lado sus concentraciones extracelulares disminuyeron un 25,44% (29,39 nM) de las concentraciones basales ($39,42\pm 8,00$) con la llegada de la luz ($n=6$; $p<0,001$) y aumentaron con el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 91,2% (35,95 nM) de las concentraciones basales ($n=6$; $p<0,001$) (Figura 1-D). Las concentraciones de HVA en la corteza prefrontal variaron según un ritmo circadiano con su máximo durante el periodo de oscuridad.

La **actividad motora** de los animales estudiados varió según un ritmo circadiano, con su máximo en el periodo de oscuridad, que se ajustó a un modelo sinusoidal ($n=6$; $p<0,001$) de amplitud 50,25% de los niveles basales ($1012,77\pm 64,35$ n° de cortes de haz), mesor 564.7 ± 116.7 n° cortes de haz y acrofase 14 horas 37 minutos 46 segundos (Figura 2, tabla 1).

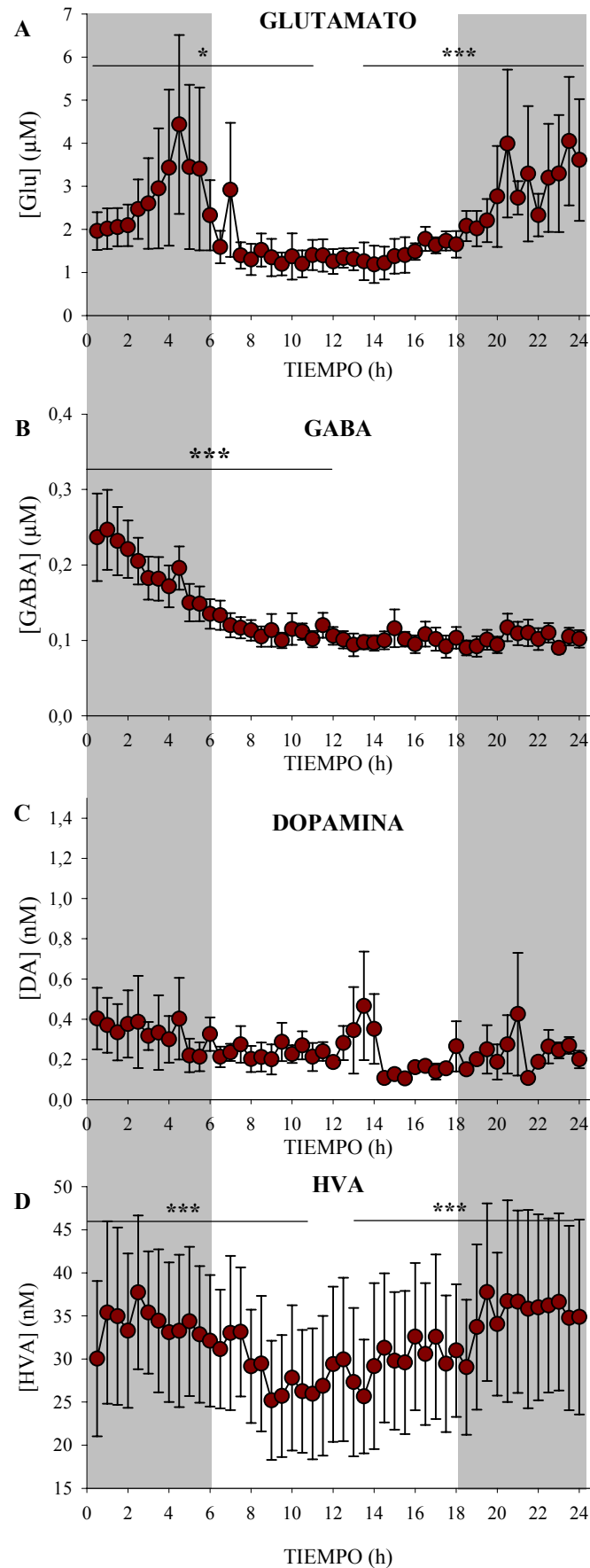


FIGURA 1: Concentraciones extracelulares de **A)** glutamato, **B)** GABA, **C)** dopamina y **D)** HVA en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/ 12h luz. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$

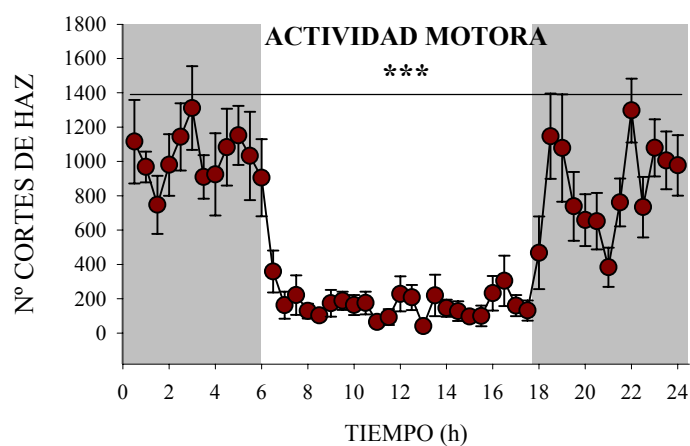


FIGURA 2: Actividad motora de los animales estudiados durante del experimento bajo un ciclo 12h oscuridad/ 12h luz. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$

	PARÁMETROS DEL RITMO		
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
GLU	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal. Regresiones significativas.		
GABA	-----		
DA	-----		
HVA	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal. Regresiones significativas.		
ACT. MOTORA	508,9±116,7 n.c.h.	567,7±31,91 n.c.h.	3,83 radianes

TABLA 1: Parámetros de los ritmos circadianos neurotransmisores en la corteza prefrontal y de la actividad motora de ratas bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz. n.c.h.= nº de cortes de haz.

IV. Discusión

En la corteza prefrontal, las concentraciones extracelulares de glutamato y HVA pero no de dopamina y GABA presentaron variaciones circadianas.

Hay muy pocos estudios sobre las variaciones extracelulares de glutamato y GABA, y no son en la corteza prefrontal. Fuera del núcleo supraquiasmático, estudios previos de nuestro laboratorio describen un ritmo circadiano del glutamato en estriado (Marquez de Prado et al., 2000; Castañeda et al., 2004) y núcleo accumbens (Castañeda et al., 2004). En el núcleo supraquiasmático se han descrito las variaciones circadianas de glutamato (Honma et al., 1996), los autores de dicho trabajo abren la posibilidad de que estas variaciones sean debidas a las variaciones en la actividad de los astrocitos. En los astrocitos se encuentra la gran mayoría de los transportadores que recapturan el glutamato liberado y con su actividad regulan la cantidad de glutamato existente en el espacio extracelular. Por otro lado se ha demostrado recientemente que los astrocitos son capaces de liberar glutamato mediante un mecanismo calcio dependiente (Araque et al., 1999; Haydon et al., 2000) o a través del transportador (Attwell et al., 1993). Se ha descrito ritmicidad circadiana en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), una proteína astrocitaria que es índice de la actividad de estas células (Lavialle y Servièrè, 1993). Esta ritmicidad en los astrocitos se podría dar en otras áreas del SNC. Por tanto, es posible que las variaciones circadianas que encontramos en las concentraciones extracelulares de glutamato en corteza prefrontal sean debidas a una variación circadiana de la actividad de los astrocitos de estas áreas.

En el caso del GABA encontramos una disminución significativa de sus concentraciones en el cambio de periodo de oscuridad a luz pero no un aumento significativo en el segundo periodo de oscuridad. Esta ausencia de ritmo circadiano en las concentraciones extracelulares de GABA no implica que la fisiología del sistema GABAérgico no varíe a lo largo del día. De hecho se han descrito variaciones circadianas en el número y afinidad de receptores GABA en el sistema nervioso central (Wirz-Justice, 1987), y estas variaciones se mantienen en oscuridad continua y se pierden tras la lesión bilateral del núcleo supraquiasmático (Wirz-Justice, 1987; Kafka et al., 1985). En la corteza cerebral se ha descrito una variación circadiana en la densidad de los receptores de GABA (Kanterewicz et al., 1995) y en la afinidad de estos receptores a la unión de GABA (Acuña-Castroviejo, 1986) siendo ambos parámetros mayores en la oscuridad. Esto podría indicar una variación circadiana de la actividad basal GABAérgica en la corteza prefrontal, regulada por la variación de la densidad de receptores en vez de por los niveles del neurotransmisor.

No observamos ritmo circadiano en las concentraciones extracelulares de dopamina, pero su metabolito, el HVA, mostró un ritmo circadiano con un máximo en el periodo de oscuridad. En contraste con las concentraciones extracelulares de dopamina en estriado, en corteza prefrontal sus concentraciones extracelulares son muy bajas, sólo la adición de un inhibidor de la recaptura de dopamina, la nomifensina, nos permite elevar las concentraciones extracelulares de dopamina por encima del límite de detección, 0,1 nM (Santiago et al., 1993). Aún así las concentraciones de dopamina no son suficientemente altas como para detectar disminuciones en sus concentraciones extracelulares y por tanto variaciones circadianas. Los metabolitos de dopamina, principalmente el HVA, se consideran un reflejo de la liberación de dopamina (Westerink, 1995). Incluso grupos de investigación que usan la voltametría como método de detección de catecolaminas, una técnica más sensible que la microdialisis unida al HPLC, utilizan las concentraciones de HVA como índice de la liberación de dopamina (O'Neill y Fillenz, 1985). Nakayama y colaboradores, describen un ritmo circadiano de

dopamina en la corteza prefrontal (Nakayama et al., 1993), en el artículo donde se describen estos resultados los métodos de detección no están especificados. Sin embargo en un trabajo posterior del mismo autor, no se miden las concentraciones extracelulares de dopamina y se utilizan las concentraciones extracelulares de HVA como índice de la liberación de dopamina (Nakayama, 2002). Otro trabajo describe una diferencia de concentraciones extracelulares de dopamina en corteza prefrontal, en condiciones de luz frente a condiciones de oscuridad. En este caso comparan los niveles de dopamina de dos grupos de ratas: a un grupo se les realiza la microdiálisis durante su periodo de luz y al otro durante su periodo de oscuridad (Feenstra et al, 2000). A pesar de no ser un estudio temporal, los resultados de este estudio apoyarían la existencia de un ritmo circadiano de dopamina en corteza prefrontal.

Los niveles de dopamina y sus metabolitos, medidos mediante la técnica de microdiálisis, se consideran reflejo directo de la liberación neuronal (Timmerman y Westerink, 1997; Del Arco et al., 2003). Todo esto indica que existe una actividad rítmica del sistema dopaminérgico proveniente del área tegmental ventral en esta estructura. Sin embargo las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral no muestran una diferencia de actividad, medida como tasa de disparo espontánea, entre la noche y el día (Miller et al., 1983). Por otro lado, el hecho de que un porcentaje de neuronas dopaminérgicas de esta área no presenten una actividad basal espontánea (Miller et al., 1981) implicaría que las diferencias en la actividad de la vía mesocortical podrían deberse al reclutamiento de neuronas en los momentos de actividad basal elevada.

La actividad motora de los animales estudiados muestra un ritmo circadiano con un máximo en el periodo de oscuridad. El ritmo circadiano de actividad motora es un ritmo endógeno que está controlado por el núcleo supraquiasmático (García Fernández, 1998; Carlson, 1999; Moore, 1999). Lesiones de este núcleo alteran el ritmo circadiano de actividad motora (Satinoff y Prosser, 1988). En animales nocturnos presenta su máximo en el periodo de oscuridad, que es el que coincide con el periodo activo del animal, y en curso libre presenta un periodo de 25 horas que se sincroniza con la longitud del día físico a través del fotoperiodo, la temperatura externa y otros sincronizadores externos (Moore, 1999).

Bloque Experimental 2

Efecto de los cambios en el ciclo oscuridad/luz sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en Corteza Prefrontal y de actividad motora de la rata despierta.

I. Introducción

Los ritmos circadianos endógenos se caracterizan por mantener su ritmo circadiano en ausencia de marcadores externos de tiempo como la luz (Bensataali et al., 2001). Sin embargo la alternancia oscuridad/luz o fotoperiodo es el principal marcador temporal externo para los ritmos circadianos de manera que modificaciones en la fase de los ritmos circadianos en curso libre se ajusten a la duración del día físico. La exposición a luz continua modifica los ritmos circadianos endógenos (Benstaali et al., 2001; Erren et al, 2003) llegando a suprimir algunos de ellos como el incremento nocturno de la secreción de melatonina, actividad motora o el ritmo circadiano de la bebida (Homma et al., 1996; Benstaali et al., 2001). También se ha descrito la supresión del ritmo circadiano en la actividad de neuronas dopaminérgicas del área tuberal hipotalámica así como del ritmo circadiano de la secreción de prolactina (Shieh et al., 1997). También se ha descrito que un pulso de luz suficientemente largo inhibe la síntesis y liberación de melatonina alterando su ritmo circadiano (Reiter, 1991) y que la perfusión intracerebral de melatonina en estriado altera los ritmos circadianos de glutamato y GABA pero no de dopamina (Márquez de Prado et al., 2000). En oscuridad continua, y en ausencia de otros marcadores temporales, los ritmos circadianos oscilan según su periodo intrínseco-en curso libre- que en animales nocturnos suele ser mayor al periodo de 24 horas.

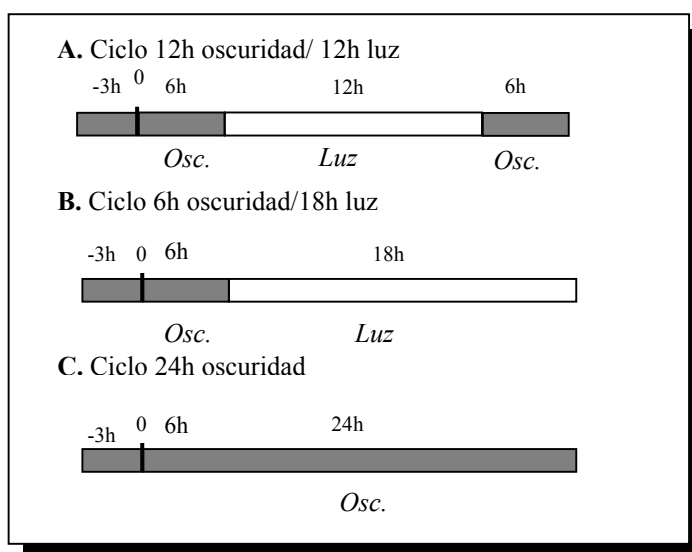
Los ritmos circadianos de neurotransmisores pueden ser endógenos, siendo regulados directamente por el reloj endógeno, el núcleo supraquiasmático en mamíferos; o ser consecuencia directa de la alternancia de la presencia/ausencia de luz. Existe un sustrato neuronal que permitiría la regulación circadiana de la corteza prefrontal por el reloj endógeno. Recientemente se ha descrito una vía mutisináptica que conecta el núcleo supraquiasmático con el área paraventricular del tálamo y ésta con la corteza prefrontal (Sylvester et al., 2002). Por otro lado, existe una vía neuronal que llevaría la información de la presencia/ausencia de luz a la corteza prefrontal sin pasar por el sistema circadiano. Los núcleos del rafe reciben aferencias desde retina (Meijer y Rietveld, 1989; Morin, 1994), y a su vez, la corteza prefrontal recibe aferencias serotoninérgicas de núcleos del rafe (Uylings y Van Eden, 1990). Además se ha sugerido que las neuronas serotoninérgicas actúan como moduladores del estado de activación del comportamiento y fisiología del organismo, ya que cambian de actividad según los distintos momentos del ciclo sueño vigilia y sus conexiones forman una extensa red en el sistema nervioso central (Jacobs y Azmitia, 1992).

El objetivo de este bloque experimental fue el estudio del efecto de los cambios de las características del fotoperiodo sobre los ritmos circadianos de actividad motora con el fin de estudiar su regulación.

II. Material y Métodos

En este bloque experimental se utilizaron ratas wistar macho de 2-4 meses, mantenidas en un ciclo 12h oscuridad/12h luz y temperatura constante de 24° C. 10-15 días tras la implantación estereotáxica de las cánulas guía se llevaron a cabo los experimentos de microdiálisis en la rata despierta utilizando LCRs a un flujo de 1,25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Al líquido cefalorraquídeo sintético se añadió 5 μM de nomifensina (RBI, Research Biochemicals internacional) con el objetivo de incrementar los niveles de dopamina endógena y así detectar y cuantificar con más precisión los niveles basales de dopamina (Santiago et al., 1993). Tras tres horas de estabilización se recogieron muestras cada 30 minutos durante 24 horas (2 p.m. a 2 p.m. del día siguiente) bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz, 6h oscuridad/12h luz y 24h oscuridad.

Protocolo del experimento:



Para la detección de glutamato y GABA se separaron 5 μl de la muestra que se analizaron mediante HPLC acoplado a un sistema de detección fluorométrica, y para la detección de dopamina y HVA se separaron 25 μl de la muestra que se analizaron mediante HPLC acoplado a un sistema de detección electroquímica. Los datos cromatográficos se procesaron usando el programa informático MAXIMA® (Waters). Las concentraciones basales se calcularon como la media de las concentraciones de las 4 primeras horas de microdiálisis.

Al finalizar los experimentos se realizó un examen histológico para comprobar la correcta localización de la cánula de microdiálisis.

Las concentraciones obtenidas se analizaron estadísticamente a través de método de Cosinor y/o un ANOVA seguido de un análisis de regresión (ver capítulo de material y métodos general en esta misma tesis doctoral).

III. Resultados

Los resultados se presentan en gráficas de valores absolutos de concentración (μM para glutámico y GABA, nM dopamina y HVA) y de niveles de para la actividad motora (n° de cortes de haz). Y tablas con los parámetros de los ritmos circadianos en caso de que se ajuste a un modelo sinusoidal.

Las concentraciones extracelulares basales en la corteza prefrontal en el grupo 12h oscuridad/12h luz fueron: Glutamato = $2,45 \pm 0,76 \mu\text{M}$; dopamina = $0,27 \pm 0,10 \text{ nM}$; HVA = $39,42 \pm 8,00 \text{ nM}$ y los niveles basales de actividad motora fueron $1012,77 \pm 64,35 \text{ n}^\circ$ de cortes de haz. En el grupo 6h oscuridad/18h luz las concentraciones extracelulares basales fueron: Glutamato = $1,69 \pm 0,31 \mu\text{M}$; dopamina = $0,26 \pm 0,04 \text{ nM}$; HVA = $41,19 \pm 5,95 \text{ nM}$ y los niveles basales de actividad motora de los animales fueron de $1079,58 \pm 125,18 \text{ n}^\circ$ de cortes de haz. En el grupo 24h oscuridad las concentraciones extracelulares fueron: Glutamato = $1,91 \pm 0,30 \mu\text{M}$; dopamina = $0,25 \pm 0,04 \text{ nM}$; HVA = $44,60 \pm 7,94 \text{ nM}$ y los niveles basales de actividad motora fueron $1112,67 \pm 194,62 \text{ n}^\circ$ de cortes de haz.

Las concentraciones extracelulares de **glutamato** en la corteza prefrontal bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz no se ajustaron poblacionalmente a un modelo sinusoidal aunque 6 de los 6 animales estudiados mostraron un ritmo circadiano que sí se ajustó a dicho modelo. Por otro lado se produjo una disminución de un 48,98% ($1,25 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales ($2,45 \pm 0,76 \mu\text{M}$) en las concentraciones extracelulares de glutamato en el cambio al periodo de luz ($n=6$; $p<0,05$) y aumentaron durante el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 135% ($3,31 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales ($n=6$; $p<0,001$) (Figura 3-A).

Las variaciones circadianas de glutamato no se alteraron al cambiar el ciclo oscuridad/luz a 6h oscuridad/18h luz. Aunque las concentraciones extracelulares de glutamato no se ajustaron a un modelo sinusoidal en estas condiciones, 5 de los 6 animales estudiados mostraron un ritmo circadiano de glutamato que sí se ajustó a dicho modelo sinusoidal cuando se estudiaron individualmente. Además dichas concentraciones disminuyeron un 39,95% ($1,15 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales ($1,69 \pm 0,31 \mu\text{M}$) con el paso al periodo de luz ($n=6$, $p<0,05$) y aumentaron hasta alcanzar un 177,5% ($2,99 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales en el periodo de luz que correspondería al segundo periodo de oscuridad ($n=6$, $p<0,001$) (Figura 3-B). En un ciclo de 24 horas de oscuridad las concentraciones extracelulares de glutamato no mostraron variaciones circadianas ($n=5$) (Figura 3-C).

Las concentraciones extracelulares de **dopamina** no mostraron un ritmo circadiano en ninguna de las condiciones de modificación del ciclo oscuridad/luz estudiadas ($n=5$ en todos los grupos), ya que no se ajustaron a un modelo sinusoidal y sus concentraciones extracelulares no disminuyeron ni aumentaron con los cambios de periodo del ciclo oscuridad/luz (Figura 4).

Las concentraciones extracelulares de **HVA** bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz no se ajustaron poblacionalmente a un modelo sinusoidal aunque 4 de los 6 animales estudiados mostraron un ritmo circadiano de HVA que sí se ajustó a dicho modelo. Por otro lado sus concentraciones extracelulares disminuyeron un 25,44% ($29,39 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($39,42 \pm 8,00$) con la llegada de la luz ($n=6$; $p<0,001$) y aumentaron con el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 91,2% ($35,95 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($n=6$; $p<0,001$) (Figura 5-A).

En condiciones de ciclo 6 horas oscuridad/18 horas luz, las concentraciones extracelulares de HVA no se ajustaron a un modelo sinusoidal, aunque 4 de los 6 animales estudiados mostraron un ritmo circadiano que sí se ajustó a dicho modelo. Por otro lado las concentraciones extracelulares de HVA disminuyeron un 21,5% ($32,48 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($41,19 \pm 5,95 \text{ nM}$) en el cambio de periodo de oscuridad a periodo de

luz ($n=6$, $p<0,01$) pero el aumento de las concentraciones en el periodo de luz que correspondería con el segundo periodo de oscuridad no fue significativo ($n=6$, $p>0,05$) (Figura 5-B). Bajo un ciclo de 24 horas de oscuridad las concentraciones extracelulares de HVA mostraron un ritmo circadiano, con su máximo en la oscuridad, que se ajustó ($n=6$, $p<0,05$) a un modelo sinusoidal de amplitud 17,47% de las concentraciones basales ($44,60\pm 7,94$ nM), mesor $39,7\pm 6,39$ nM y acrofase 18 horas 54 minutos 27 segundos (Figura 5-C, tabla 2).

La **actividad motora** de los animales estudiados bajo un ciclo 12 horas oscuridad/12 horas luz varió según un ritmo circadiano, con su máximo en el periodo de oscuridad, que se ajustó a un modelo sinusoidal ($n=6$; $p<0,001$) de amplitud 50,25% de los niveles basales ($1012,77\pm 64,35$ n° de cortes de haz), mesor $564,7\pm 116,7$ n° cortes de haz y acrofase 14 horas 37 minutos 46 segundos (Figura 6-A, tabla 2).

En los animales estudiados bajo un ciclo 6 horas oscuridad/18 horas luz, la actividad motora mostró un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajustó a un modelo sinusoidal ($n=6$, $p<0,01$) de amplitud 35,15% de los niveles basales ($1079,58\pm 125,18$ n° de cortes de haz), mesor $661,9\pm 47,39$ n° de cortes de haz y acrofase 16 horas 20 minutos 24 segundos (Figura 6-B, tabla 2). Al comparar este ritmo con el ritmo circadiano de actividad motora de los animales de ciclo 12h oscuridad/12 h luz, el test del mesor no mostró diferencias ($p>0,05$) mientras que sí hubo diferencias cuando se aplicó el test conjunto de la amplitud-acrofase ($p<0,01$). No se observaron diferencias entre los niveles de actividad motora entre ambos grupos. Luego la significación del test amplitud-acrofase parece debida a la acrofase.

En los animales estudiados en un ciclo de 24 horas de oscuridad, la actividad motora mostró un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajustó a un modelo sinusoidal ($n=6$, $p<0,01$) de amplitud 54,35% de los niveles basales ($1112,67\pm 194,62$ n° de cortes de haz), mesor $665,4\pm 108,7$ n° de cortes de haz y acrofase 17 horas 50 minutos y 17 segundos (Figura 6-C, tabla 2). Al comparar este ritmo con el del grupo que se encuentra en condiciones 12h oscuridad/12h luz, el test para el mesor no mostró diferencias ($p>0,05$) mientras sí hubo diferencias cuando se aplicó el test conjunto de la amplitud-acrofase ($p<0,01$). No hay diferencias entre los niveles de actividad motora, la significación de este test es debida a diferencias en la acrofase.

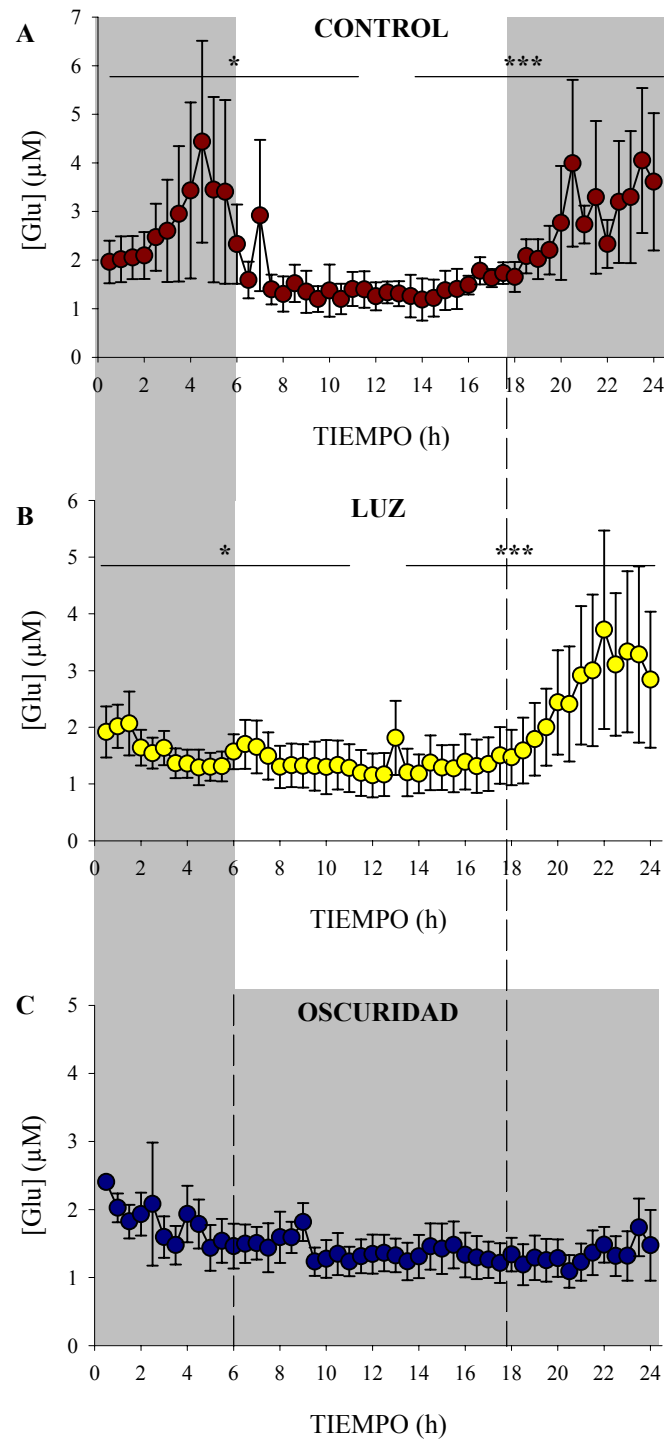


FIGURA 3: Concentraciones extracelulares de glutamato en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo **A)** 12h oscuridad/12h luz, **B)** 6h oscuridad/ 18h luz y **C)** 24h oscuridad. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

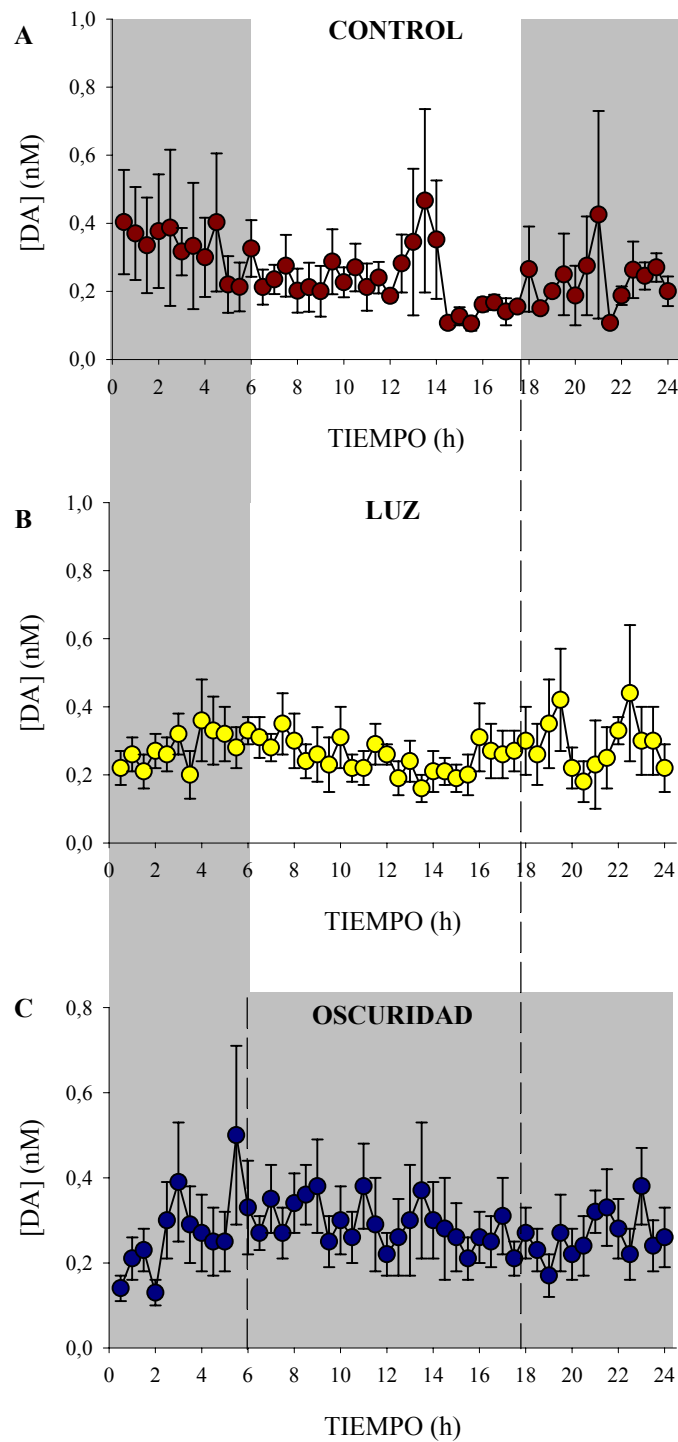


FIGURA 4: Concentraciones extracelulares de dopamina en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo **A)** 12h oscuridad/12h luz, **B)** 6h oscuridad/ 18h luz y **C)** 24h oscuridad. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

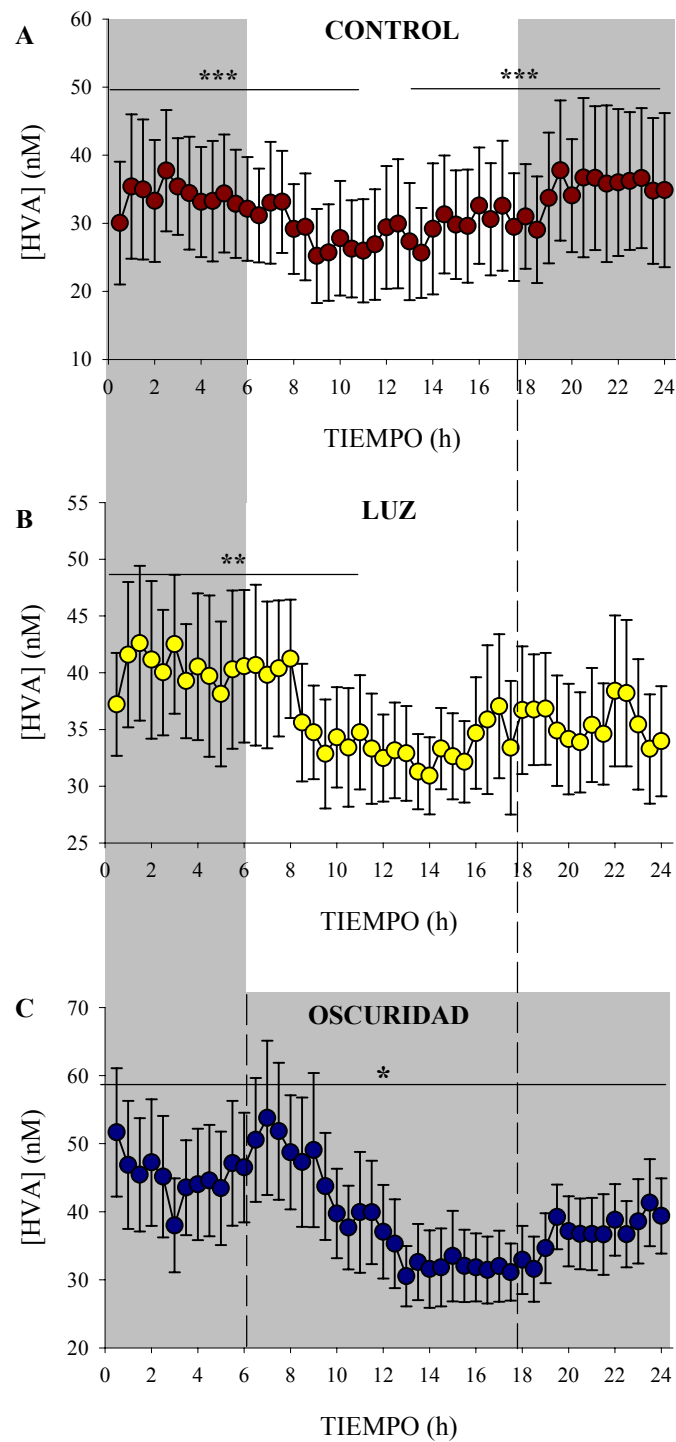


FIGURA 5: Concentraciones extracelulares de HVA en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo **A)** 12h oscuridad/12h luz, **B)** 6h oscuridad/ 18h luz y **C)** 24h oscuridad. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

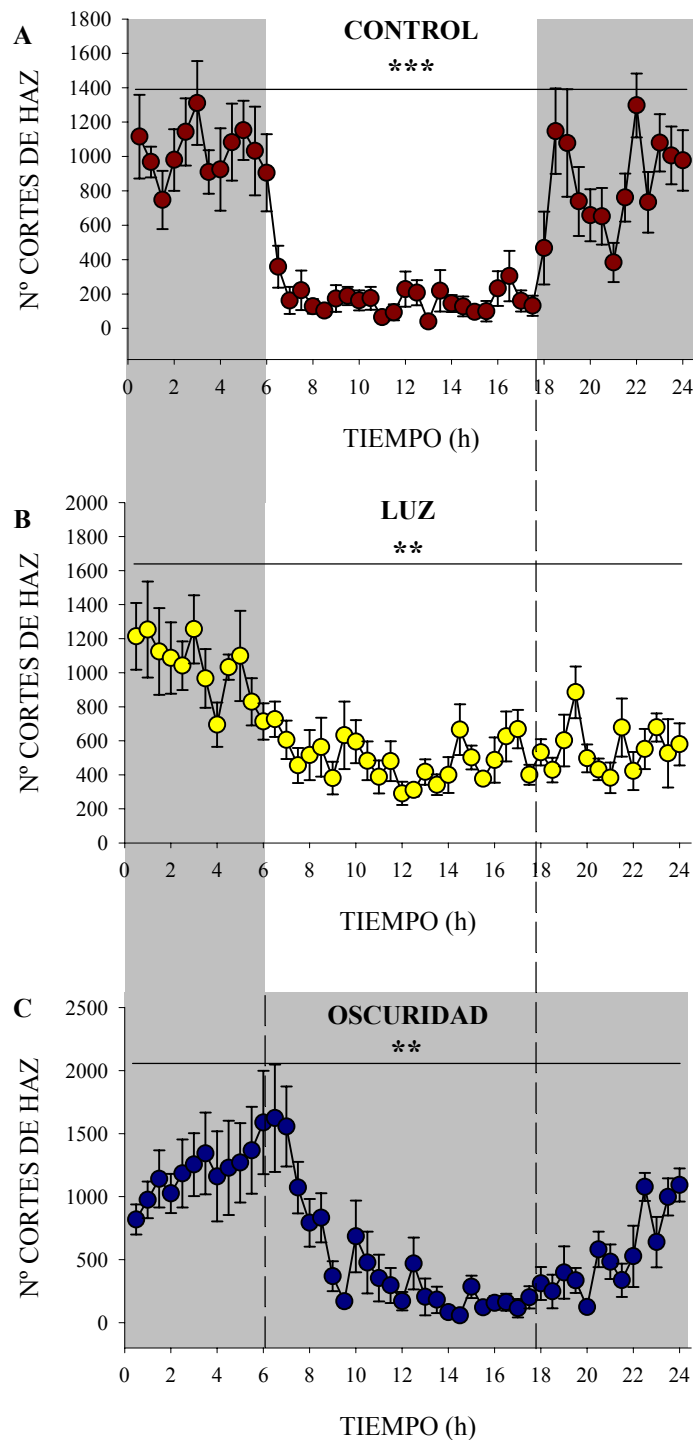


FIGURA 6: Actividad motora de los animales estudiados bajo un ciclo **A)** 12h oscuridad/12h luz, **B)** 6h oscuridad/ 18h luz y **C)** 24h oscuridad. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

		PARÁMETROS DEL RITMO		
		AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
CONTROL	Glu	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal. Regresiones significativas.		
	DA	-----		
	HVA	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal. Regresiones significativas.		
	ACT. MOTORA	508,9±116,7 n.c.h.	567,7±31.91 n.c.h.	3,83 radianes
LUZ	Glu	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal. Regresiones significativas.		
	DA	-----		
	HVA	-----		
	ACT. MOTORA	368,7±153,1 n.c.h.	641,9±47,39 n.c.h.	4,28 radianes
OSCURIDAD	Glu	-----		
	DA	-----		
	HVA	7,79±10,7 nM	39,7±6,39 nM	4,95 radianes
	ACT. MOTORA	665,4±108,7 n.c.h.	665,4±108,7 n.c.h.	4,67 radianes

TABLA 2: Parámetros de los ritmos circadianos neurotransmisores y de la actividad motora de ratas bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz, 6h oscuridad/18h luz, 24h oscuridad. n.c.h.= nº de cortes de haz.

IV. Discusión

El ritmo circadiano se mantiene bajo el ciclo 6 horas oscuridad/18 horas luz pero se pierde bajo el ciclo 24 horas de oscuridad. La dopamina no mostró ritmo circadiano bajo ninguno de los ciclos. El ritmo circadiano de HVA se pierde con la prolongación del periodo de luz hasta 18 horas pero se mantiene al eliminar el periodo de luz. Y el ritmo circadiano de actividad locomotora se mantiene en las 3 condiciones experimentales.

Los efectos del cambio del fotoperiodo sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores no está muy estudiados. La supresión del ritmo circadiano de actividad de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares por la exposición a luz continua (Shieh et al., 1997) y los efectos de los cambios del fotoperiodo sobre el ritmo circadiano de las concentraciones extracelulares de neurotransmisores en el estriado y núcleo accumbens han sido descritas con anterioridad (Castañeda et al., 2004).

El mantenimiento de ritmo circadiano de glutamato en condiciones de 6 h oscuridad/ 18h luz y su pérdida en condiciones de 24h de oscuridad implica que el ritmo circadiano de las concentraciones extracelulares de glutamato depende de la presencia de luz. El efecto de la luz sobre el glutamato podría realizarse a través de la vía retina-rafe-corteza prefrontal. De hecho, tanto la serotonina como su metabolito, el 5-HIAA, presentan un ritmo circadiano en corteza prefrontal en condiciones 12h oscuridad/12h luz (Nakayama et al., 1993; Rueter y Jacobs, 1996). Sin embargo, tan sólo un pequeño porcentaje de las concentraciones de glutamato medidas mediante la técnica de microdiálisis es aceptado como de origen neuronal. El resto se piensa que es de origen metabólico y/o astrocitario (Timmerman y Westerink, 1997; Del Arco et al., 2003). Por ello las variaciones circadianas de glutamato pueden estar reguladas, al menos en parte, por variaciones circadianas de la actividad de los astrocitos ya sea a nivel de recaptura o de liberación astrocitaria. La innervación serotoninérgica a corteza prefrontal llega en forma de varicosidades y no de sinapsis cerradas (Jansson et al., 2000). Además se ha descrito la existencia de receptores y transportadores extrasinápticos de serotonina (Bunin y Wightman, 1999) que evidencia una transmisión serotoninérgica volumétrica que llegaría tanto a neuronas glutamatérgicas como a astrocitos. Por un lado, la perfusión iontoforética de serotonina o del agonista del receptor 5-HT₃ disminuye la tasa de disparo de las neuronas de la corteza prefrontal (Edwards et al., 1996) y la inyección subcutánea de antagonistas del receptor 5-HT₆ disminuye las concentraciones extracelulares de glutamato en corteza prefrontal de manera tetrodotoxina dependiente (Dawson et al., 2001), lo que sugiere que es un efecto sobre la liberación neuronal de glutamato. Por otro lado el efecto de la serotonina sobre el glutamato podría ser debido a efectos de esta sobre los astrocitos, ya que se ha descrito presencia de receptores serotoninérgicos en las células gliales de corteza y la serotonina es capaz de crear corrientes de Ca²⁺ en los astrocitos (Jalonen et al., 1996)

El HVA, y con él el sistema dopaminérgico, muestra un ritmo circadiano que desaparece en condiciones de luz continua. La regla de Aschoff dice que en animales nocturnos como la rata, el periodo del ritmo circadiano en luz continua es más largo que en oscuridad continua (Carpenter y Grossberg, 1984; Meijer y Rietveld, 1989), por eso es posible que el ritmo circadiano de HVA en éstas condiciones no se ajuste a un modelo sinusoidal de periodo 24 horas y al ser su periodo más largo no podamos observar un aumento significativo en la segunda mitad del experimento de microdiálisis. El hecho de que en un ciclo de 24 horas oscuridad, se mantenga el ritmo circadiano de HVA nos indica que el ritmo circadiano de HVA sería endógeno y que la luz actuaría como sincronizador de este ritmo circadiano

En caso de la actividad motora espontánea se observa un cambio en la acrofase del ritmo. Habiendo en ambos casos un aumento significativo en la acrofase, o lo que es lo mismo un retraso de fase. Las condiciones de 6h oscuridad/18h luz, serían equivalentes a dar un pulso de luz al principio de la noche subjetiva, lo que está descrito que produce un retraso de fase (Benstaali et al., 2001). Si se mantienen las horas de luz hasta establecer condiciones de luz constante, está descrito que el ritmo de actividad motora se suprime. En las condiciones de 24 horas de oscuridad el periodo del ritmo empieza a acercarse a lo que será su periodo en curso libre, perdiendo la sincronía con el fotoperiodo. Está descrito que el ritmo circadiano de actividad motora es un ritmo circadiano endógeno con un periodo en curso libre de 25 horas en roedores nocturnos, como la rata (Benstaali et al., 2001). Es un periodo mayor que el que manifiesta en condiciones de 12 horas oscuridad/12 horas luz y por ello la acrofase aumenta.

Bloque Experimental 3

Estudio de los ritmos circadianos de acetilcolina y colina en Corteza Prefrontal y de actividad motora de la rata despierta.

I. Introducción

La acetilcolina de la corteza prefrontal tiene su origen principalmente extracortical, sus eferencias provienen de neuronas localizadas en el telocéfalo basal, que incluyen septum, núcleo de la banda diagonal de Broca y núcleo basal de Meynert (*sustancia innominata*). La acetilcolina intracortical tiene su origen en neuronas intrínsecas: células no piramidales localizadas en las capas II y IV (Mora y Ferrer, 1986; Mora y Cobo, 1990; Fuster, 1997).

El sistema colinérgico de la corteza prefrontal está implicada en procesos de aprendizaje y memoria (Decker y McGraugh, 1991; Gallagher y Colombo, 1995; Pepeu y Giovannini, 2004), en procesos atencionales, modulando los mecanismos relacionados con la detección y selección de estímulos y el procesamiento de esta información (Sarter y Bruno, 1997; Perry, Walker et al., 1999) y en procesos relacionados con la memoria de trabajo (Furey et al., 2000; Pepeu y Giovannini, 2004). Algunas de estas funciones como la memoria de trabajo (Monk et al., 1997; Wright et al., 2002), o la atención (Kraemer et al. 2000) muestran un ritmo circadiano.

Se ha observado que las concentraciones extracelulares de acetilcolina varían según un ritmo circadiano en corteza prefrontal así como en hipocampo (Day et al., 1991; Mizuno et al., 1991; Kametani y Kawamura, 1991; Jimenez-Capdeville y Dykes, 1993; Mitsushima et al., 1996). Este ritmo circadiano se caracteriza por mostrar un máximo en sus concentraciones extracelulares en el periodo de oscuridad y por mantenerse en condiciones de oscuridad continua (Kametani & Kawamura, 1991), lo que sugieren que es un ritmo endógeno.

Diversos autores sugieren que existe una relación entre la actividad motora y los niveles de acetilcolina en la corteza prefrontal (Day et al., 1991; Mizuno et al., 1991). El ritmo circadiano de actividad motora es una de los más estudiados (Schwartz y Zimmerman, 1990; Lesauter y Silver, 1999). Y los niveles de acetilcolina en casi todas las estructuras estudiadas está elevado cuando el animal está activo desde un punto de vista motor, tanto actividad motora espontánea como estimulada.

Aunque el ritmo circadiano de acetilcolina en corteza prefrontal se ha descrito previamente, el objetivo de este bloque experimental fue la caracterización del ritmo circadiano de acetilcolina en a un área específica de la corteza prefrontal, la corteza prefrontal medial.

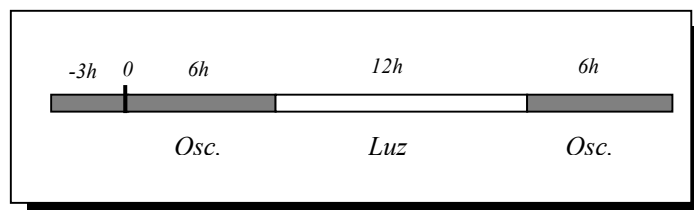
II. Material y Métodos

En este bloque experimental se utilizaron ratas wistar macho de (2-4 meses), mantenidas en un ciclo 12h oscuridad/12h luz (light off 8 a.m./light on 8:00 p.m.) y temperatura constante de 24° C. 10-15 días tras la implantación estereotáxica de las cánulas guía se llevaron a cabo los experimentos de microdiálisis en la rata despierta.

Para poder medir la acetilcolina con el resto de los neurotransmisores se añadió al LCRs 1 μM de neostigmina (además de la nomifensina 5 μM) para elevar los niveles basales de acetilcolina y poderlo detectar y cuantificar con mayor precisión (Pepeu y Giovanni, 2004) y

se elevó el flujo de perfusión a 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Tras tres horas de estabilización se recogieron muestras cada 30 minutos durante 24 horas (2 p.m. a 2 p.m. del día siguiente) bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz

Protocolo del experimento:



Para el análisis de acetilcolina y colina, se separaron 10 μl del volumen de la muestra y se analizaron por HPLC acoplado a detección electroquímica previo tratamiento enzimático (Ver material y métodos general para mayor detalle). Los datos cromatográficos se procesaron usando el programa informático HPChemStation (Hewlett-Packard). Las concentraciones basales se calcularon como la media de las concentraciones de las 4 primeras horas de microdiálisis.

Al finalizar los experimentos se realizó un examen histológico para comprobar la correcta localización de la cánula de microdiálisis.

Las concentraciones obtenidas se analizan estadísticamente a través de método de Cosinor y/o un ANOVA seguido de un análisis de regresión (ver material y métodos general para más detalles).

III. Resultados

Los resultados se presentan en gráficas de valores absolutos de concentración (nM acetilcolina y colina) y de niveles de para la actividad motora (n° de cortes de haz). Y tablas con los parámetros de los ritmos circadianos en caso de que se ajuste a un modelo sinusoidal.

Las concentraciones extracelulares basales de acetilcolina y su metabolito en la corteza prefrontal fueron: acetilcolina = $32,34 \pm 5,89$ nM; colina = $1316,13 \pm 234,00$ nM y los niveles basales de actividad motora de las animales fueron de $677,00 \pm 302,74$ n° de cortes de haz.

Las concentraciones extracelulares de **acetilcolina** en la corteza prefrontal mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajustó a un modelo sinusoidal ($n=5, p<0,01$) de amplitud 34,66% de las concentraciones basales ($32,34 \pm 5,89$ nM), mesor $27,57 \pm 6,9$ nM y acrofase de 14 horas 42 minutos 21 segundos (Figura 7-A, tabla 3).

Su principal metabolito, la **colina**, no mostró variaciones circadianas de sus concentraciones extracelulares ($n=5$), no se ajustó poblacionalmente a un modelo sinusoidal y sus concentraciones extracelulares no disminuyeron ni aumentaron con los cambios de periodo del ciclo oscuridad/luz (Figura 7-B).

La **actividad motora** de los animales estudiados mostró un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajustó a un modelo sinusoidal ($n=5$, $p<0,05$) de amplitud 72,94% de los niveles basales ($677,00\pm 302,74$ n° de cortes de haz), mesor $649,9\pm 73,65$ n° de cortes de haz y acrofase de 14 horas 14 minutos 51 segundos (Figura 7-C, tabla 3).

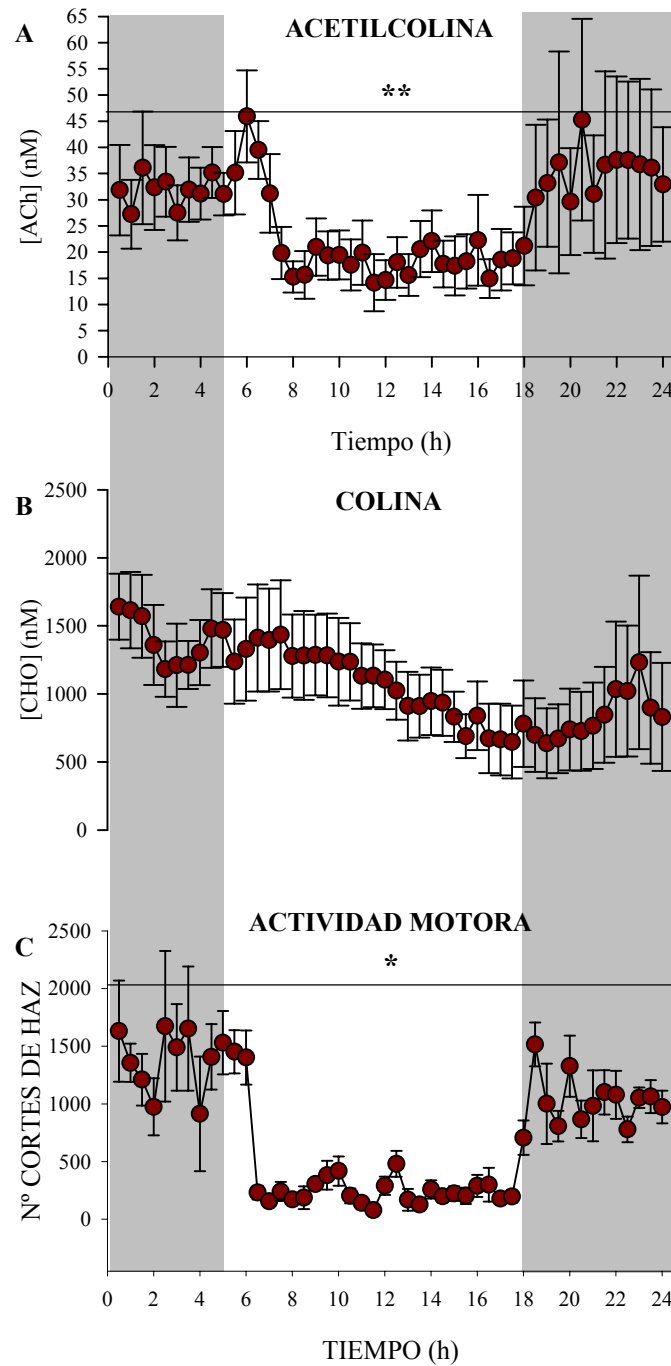


FIGURA 7: Concentraciones extracelulares de **A)** acetilcolina, **B)** colina en la corteza prefrontal de la rata despierta y **C)** niveles de actividad motora de los animales estudiados bajo un ciclo 12h oscuridad/ 12h luz. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$

	PARÁMETROS DEL RITMO		
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
ACh	11,21±10,2 nM	27,57±6,9 nM	3,85 radianes
CHO	-----		
ACT. MOTORA	493,8±481,8 n.c.h.	649,9±73,65 n.c.h.	3,73 radianes

TABLA 3: Parámetros de los ritmos circadianos neurotransmisores en la corteza prefrontal y de la actividad motora de ratas bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz. n.c.h.= nº de cortes de haz.

IV. Discusión

Las concentraciones extracelulares de acetilcolina presentan un ritmo circadiano con un pico máximo de sus concentraciones en el periodo de oscuridad. Las concentraciones extracelulares de su metabolito, colina, no muestran variaciones circadianas a lo largo del experimento. La actividad motora de los animales estudiados muestra un ritmo circadiano.

La acetilcolina mediada mediante la técnica de microdiálisis se considera de origen neuronal ya que es sensible a TTX y dependiente de Ca^{2+} (Pepeu y Giovannini, 2004), proveniente de la liberación de los terminales colinérgicos que provienen de telencéfalo basal. Un ritmo circadiano en las concentraciones extracelulares de acetilcolina sería, por tanto, reflejo de una variación circadiana de la actividad de los terminales colinérgicos. Estos resultados muestran un ritmo circadiano de acetilcolina en corteza prefrontal medial que coincide con el descrito en la corteza prefrontal en general (Kametani y Kawamura, 1991; Mitsushima et al., 1996). Al igual que este último, es posible que el ritmo circadiano de acetilcolina en la corteza prefrontal medial esté bajo el control directo del reloj circadiano, ya que esta área de corteza recibe inervación de dicho reloj (Sylvester et al., 2002).

En nuestros experimentos tanto las concentraciones de acetilcolina como los niveles de actividad motora presentan un ritmo circadiano con un máximo en el periodo de oscuridad. Algunos trabajos describen la existencia de una correlación entre las concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal y los niveles de actividad motora, y sugieren una relación causal entre ellas (Day, 1991; Mizuno, 1991). Sin embargo otra serie de resultados no confirman esta correlación entre estos dos parámetros (Day y Fibiger, 1992; Moore et al, 1992; Giovanni et al., 2001), y subrayan que debido a la cantidad de funciones asociadas a la liberación de acetilcolina la relación entre las concentraciones de acetilcolina y los niveles de actividad motora podrían estar enmascaradas (Pepeu y Giovannini, 2004). Es posible que ambos ritmos estén controlados por el núcleo supraquiasmático y por ello coincidan en su perfil temporal sin que esto implique una relación causal. Está bien establecido que el ritmo circadiano de actividad motora depende del núcleo supraquiasmático (Satinoff y Prosser, 1988; Moore, 1999) y existe el sustrato neuronal que permitiría la regulación del ritmo circadiano de acetilcolina por parte del núcleo supraquiasmático (Sylvester et al., 2002).

El ritmo circadiano de acetilcolina estaría más relacionado con la regulación de las funciones cognitivas de la corteza prefrontal, algunas de las cuales muestran un ritmo circadiano como la memoria de trabajo (Monk et al., 1997; Wright et al., 2002), el estado de ánimo (Owens et al., 2000; Adan y Sánchez-Turet, 2001) o la atención (Kraemer et al. 2000). De hecho se ha relacionado un incremento en la liberación de acetilcolina en la corteza prefrontal de la rata con atención visual, memoria de trabajo, nivel de alerta, estimulación sensorial y tareas de atención visoespacial (Pepeu y Giovannini, 2004).

Bloque Experimental 4

Efecto de la perfusión local de melatonina en Corteza Prefrontal sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores y actividad motora de la rata despierta.

I. Introducción

Durante las dos últimas décadas se han estudiado ampliamente los efectos de la melatonina sobre distintos parámetros fisiológicos y endocrinos (Reiter, 1989). En mamíferos, la secreción de melatonina por la glándula pineal es considerada una eferencia directa del sistema de organización circadiana del cerebro (Cassone, 1990; Redman et al., 1983; Krause y Dubocovich, 1990). Esta glándula pineal es inervada por el núcleo supraquiasmático a través de una vía multisináptica que conecta con el núcleo paraventricular del hipotálamo y en el ganglio cervical superior. Durante la noche, el núcleo supraquiasmático, a través de esta vía, estimula la síntesis de melatonina y la inhibe durante el día. La melatonina no se almacena, sino que es directamente liberada al torrente sanguíneo y al líquido cefalorraquídeo tras su síntesis. De esta manera los niveles de melatonina circulantes están elevados durante el periodo de oscuridad y bajos durante el periodo de luz (Cassone, 1990). La melatonina alcanza la mayoría de las áreas cerebrales (Krause y Dubocovich, 1990) ya que al ser una molécula lipofílica atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica. Entre otras acciones la melatonina afecta directamente a la actividad eléctrica y metabólica del núcleo supraquiasmático. Recientemente se ha descrito la existencia de receptores de membrana específicos para la melatonina y se ha mostrado su localización en distintas áreas cerebrales entre las que se encuentra el núcleo supraquiasmático (Morgan et al., 1994; Drew et al., 2001). Aunque gran parte de las acciones de la melatonina parecen ligadas a su unión a estos receptores de membrana, la existencia de acciones no dependientes de la presencia de este tipo de receptor sugiere la existencia de receptores citoplasmáticos o nucleares para la melatonina (Pei y Cheung, 2003).

Entre sus múltiples acciones, la melatonina actúa como modulador de muchas de las funciones del cerebro (Reiter, 1989). De hecho, existen varios trabajos que estudian el efecto de la melatonina sobre distintos sistemas neurotransmisores. Por ejemplo se ha observado que los animales pinealectomizados muestran un aumento del número de sitios de unión para GABA y benzodiazepinas en membranas de corteza cerebral, y un aumento en los niveles de GABA en el cerebro (Rosstein y Cardinali, 1990). Estos aumentos son revertidos por la inyección diaria de melatonina (Acuña-Castroviejo et al., 1986; Rosstein y Cardenali, 1990; Golombeck et al., 1996). También se han descrito interacciones melatonin-dopamina en retina (Dubocovich, 1983; Fujieda et al., 2000; Jaliffa et al., 2000), en el hipotálamo anterior (Expósito et al., 1995) y en estriado (Khaldy et al., 2002). En esta última estructura se ha descrito, además, que la melatonina regula la función de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Zisapel, 2001) y bloquea la actividad de los receptores NMDA glutamatérgicos (Escames et al., 1998; Escames et al., 2001; Zisapel, 2001).

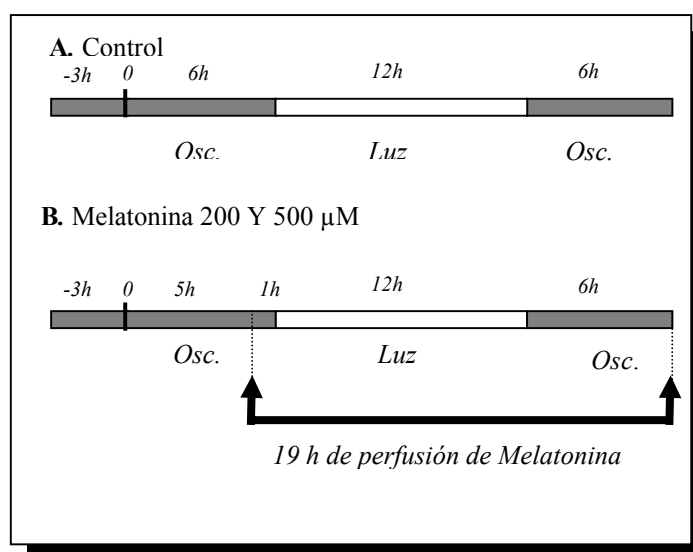
Sin embargo, pocos trabajos estudian el efecto de la melatonina sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores. Se ha descrito que la inyección diaria de melatonina recupera el ritmo circadiano de las neuronas dopaminérgicas del área tuberoinfundibular del hipotálamo que había sido suprimido por la exposición a luz continua (Shieh et al., 1997). Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la melatonina altera los ritmos circadianos de glutamato y GABA pero no los de la dopamina y sus metabolitos en el estriado (Márquez de Prado et al., 2000).

El objetivo de este bloque experimental fue estudiar los efectos de la perfusión local de melatonina (200 y 500 μM) en la corteza prefrontal sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina, HVA y acetilcolina, y su influencia sobre el ritmo circadiano de la actividad motora.

II. Material y Métodos

En este bloque experimental se utilizaron ratas wistar macho de 2-4 meses, mantenidas en un ciclo 12h oscuridad/12h luz y temperatura constante de 24° C. 10-15 días tras la implantación estereotáxica de las cánulas guía, se llevaron a cabo los experimentos de microdiálisis en la rata despierta en los que se perfundió LCRs, que contenía nomifensina 5 μM y neostigmina 1 μM para elevar los niveles basales de dopamina y acetilcolina, a un flujo de perfusión de 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. La melatonina (Sigma) se disolvió en LCRs (que contenía nomifensina 5 μM y neostigmina 1 μM), con un 10% de etanol para ayudar a su disolución. Tras tres horas de estabilización se recogieron muestras cada 30 minutos durante 24 horas bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz. El cambio de medio de perfusión durante el experimento se realizó a través de una válvula de cuatro vías (Harvard Apparatus). La melatonina, a las dosis de 200 y 500 μM , se perfundió desde una hora antes del inicio del periodo de luz y se mantuvo hasta el final del experimento.

Protocolo del experimento:



La detección y análisis de glutamato, dopamina, HVA y acetilcolina, así como la medida de la actividad motora, se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado de material y métodos.

Al finalizar los experimentos se realizó un examen histológico para comprobar la correcta localización de la cánula de microdiálisis.

Las concentraciones obtenidas se analizan estadísticamente a través de método de Cosinor y/o un ANOVA seguido de un análisis de regresión (ver material y métodos general para más detalles).

III. Resultados

Las concentraciones extracelulares basales en la corteza prefrontal en el grupo control fueron: Glutamato = $1,79 \pm 0,70$ μM ; dopamina = $0,22 \pm 0,01$ nM; HVA = $36,15 \pm 7,95$ nM; acetilcolina = $32,34 \pm 5,89$ nM y los niveles basales de actividad motora fueron $677,00 \pm 302,74$ n° de cortes de haz. En el grupo de melatonina 200 μM las concentraciones extracelulares basales fueron: Glutamato = $7,47 \pm 2,87$ μM ; dopamina = $0,60 \pm 0,15$ nM; HVA = $29,07 \pm 4,75$ nM; acetilcolina = $22,86 \pm 4,83$ nM y los niveles basales de actividad motora fueron $834,84 \pm 94,62$ n° de cortes de haz. Y en el grupo de melatonina 500 μM las concentraciones extracelulares basales fueron: Glutamato = $9,05 \pm 3,43$ μM ; dopamina = $0,56 \pm 0,14$ nM; HVA = $23,27 \pm 5,48$ nM; acetilcolina = $34,41 \pm 8,43$ nM y los niveles basales de actividad motora fueron $1398,72 \pm 194,62$ n° de cortes de haz.

Las concentraciones extracelulares de **glutamato** variaron siguiendo un ritmo circadiano con un máximo en el periodo de oscuridad. En este caso, aunque 4 de los 5 animales estudiados mostraron un ritmo circadiano que se ajustó a un modelo sinusoidal, el análisis poblacional no alcanzó significación. Sin embargo las concentraciones extracelulares de glutamato disminuyeron un 65,92% ($0,62$ μM) de las concentraciones basales ($1,79 \pm 0,70$ μM) ($n=5$, $p<0,05$) en la transición al periodo de luz y aumentaron con el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 108,3% ($1,94$ μM) de las concentraciones basales ($n=5$, $p<0,05$) (Figura 8-A).

La perfusión local en la corteza prefrontal de melatonina 200 μM no alteró las variaciones circadianas de las concentraciones extracelulares de glutamato en el mismo área. De hecho, las concentraciones extracelulares de glutamato variaron con un ritmo circadiano que se ajustó a un modelo sinusoidal ($n=5$, $p<0,01$) de amplitud 15,26 % de las concentraciones basales ($7,47 \pm 2,87$ μM), mesor $5,37 \pm 2,49$ μM y acrofase 17 horas 18 minutos 12 segundos (Figura 8-B, tabla 4). Sin embargo, la perfusión local en corteza prefrontal de melatonina 500 μM alteró el ritmo circadiano de glutamato en el mismo área, no mostrando sus concentraciones extracelulares una variación circadiana ($n=6$) (Figura 8-C).

Las concentraciones extracelulares de **dopamina** no mostraron variaciones circadianas ni en el grupo control ($n=4$), ni durante la perfusión local de melatonina 200 μM ($n=6$) o 500 μM ($n=6$), ya que sus concentraciones no se ajustaron a un modelo sinusoidal ni aumentaron ni disminuyeron con los cambios de periodo del ciclo oscuridad/luz (Figura 9).

Las concentraciones extracelulares de **HVA** no se ajustaron a un modelo sinusoidal, aunque 4 de los 5 animales estudiados mostraron un ritmo circadiano de HVA que sí se ajustó a dicho modelo. Por otro lado, las concentraciones extracelulares de HVA disminuyeron un 18,73% ($29,39$ nM) de las concentraciones basales ($36,15 \pm 7,95$ nM) con el paso al periodo de luz ($n=5$, $p<0,001$) y aumentaron en el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 99,44% ($35,95$ nM) de las concentraciones basales ($n=5$, $p<0,001$) (Figura 10-A).

Durante la perfusión local en corteza prefrontal de melatonina 200 μM el ritmo circadiano de las concentraciones extracelulares de HVA se mantuvo, ajustándose a un modelo sinusoidal ($n=6$, $p<0,01$) de amplitud 2,24% de las concentraciones basales ($29,07 \pm 4,75$ nM), mesor $20,57 \pm 6,45$ nM y acrofase 16 horas 36 minutos 57 segundos (Figura 10-B, tabla 4). Sin embargo, durante la perfusión local de melatonina 500 μM en la corteza prefrontal, el ritmo

circadiano de las concentraciones extracelulares de HVA se perdió; no mostrando variaciones circadianas (n=5) (Figura 10-C).

Las concentraciones extracelulares de **acetilcolina** en la corteza prefrontal mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajustó a un modelo sinusoidal (n=5, p<0,01) de amplitud 34,66% de las concentraciones basales (32,34±5,89 nM), mesor 27,57±6,9 nM y acrofase de 14 horas 42 minutos 21 segundos (Figura 11-A, tabla 4).

Estas variaciones circadianas de acetilcolina se mantuvieron durante la perfusión local de melatonina 200 µM, ajustándose a un modelo sinusoidal (n=6, p<0,01) de amplitud 34,03% de las concentraciones basales (22,86±4,83 nM), mesor 16,18±4,14 nM y acrofase 15 horas 7 minutos 34 segundos (Figura 11-B, tabla 4). Sin embargo, durante la perfusión local de melatonina 500 µM el ritmo circadiano de acetilcolina se perdió, no mostrando sus concentraciones extracelulares variaciones circadianas (n=5) (Figura 11-C).

La **actividad motora** de los animales estudiados mostró un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajustó a un modelo sinusoidal (n=5, p<0,05) de amplitud 72,94% de los niveles basales (677,00±302,74 n° de cortes de haz), mesor 649,9±73,65 n° de cortes de haz y acrofase de 14 horas 14 minutos 51 segundos (Figura 12-A, tabla 4).

La perfusión local en corteza prefrontal de melatonina 200 y 500 µM no alteró el ritmo circadiano de actividad motora de los animales estudiados (Figura 12-B y C, tabla 4). En ambos casos la variación circadiana de la actividad motora se ajustó a un modelo sinusoidal (n=6, p<0,001; n=5, p<0,01), de amplitud 46,09% de las concentraciones basales (834,84±94,62 n° de cortes de haz), mesor 643,9±52,89 n° de cortes de haz y acrofase 14 horas 44 minutos 39 segundos en el caso de la dosis de 200 µM; y amplitud 28,5% de las concentraciones basales (1398,72±194,62 n° de cortes de haz), mesor 1001±292,9 n° de cortes de haz y acrofase 17 horas 27 minutos 22 segundos en el caso de la dosis de 500 µM. Comparando los grupos perfundidos con melatonina con el grupo control, no se encontraron diferencias ni en el test del mesor ni en el test conjunto de amplitud-acrofase (p>0,05).

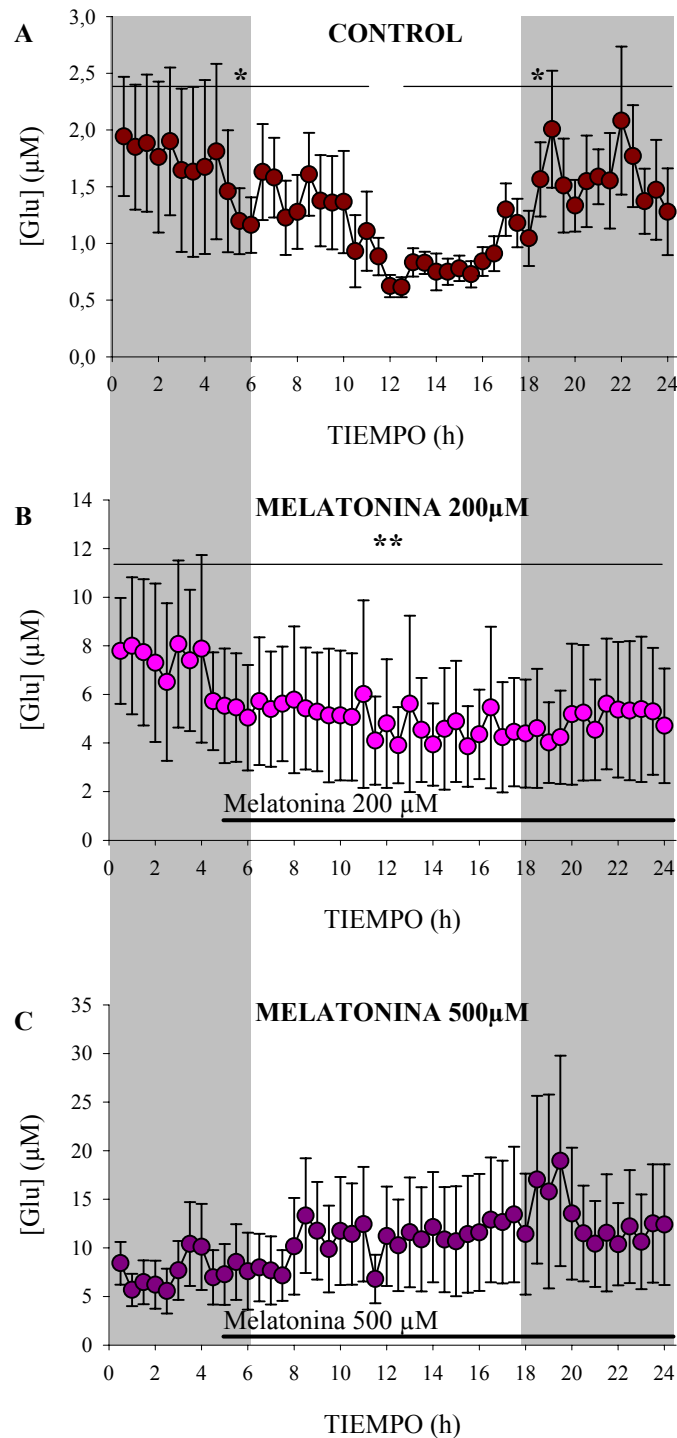


FIGURA 8: Concentraciones extracelulares de glutamato en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz **A)** en condiciones control y durante la perfusión local de melatonina **B)** 200 μM y **C)** 500 μM . * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

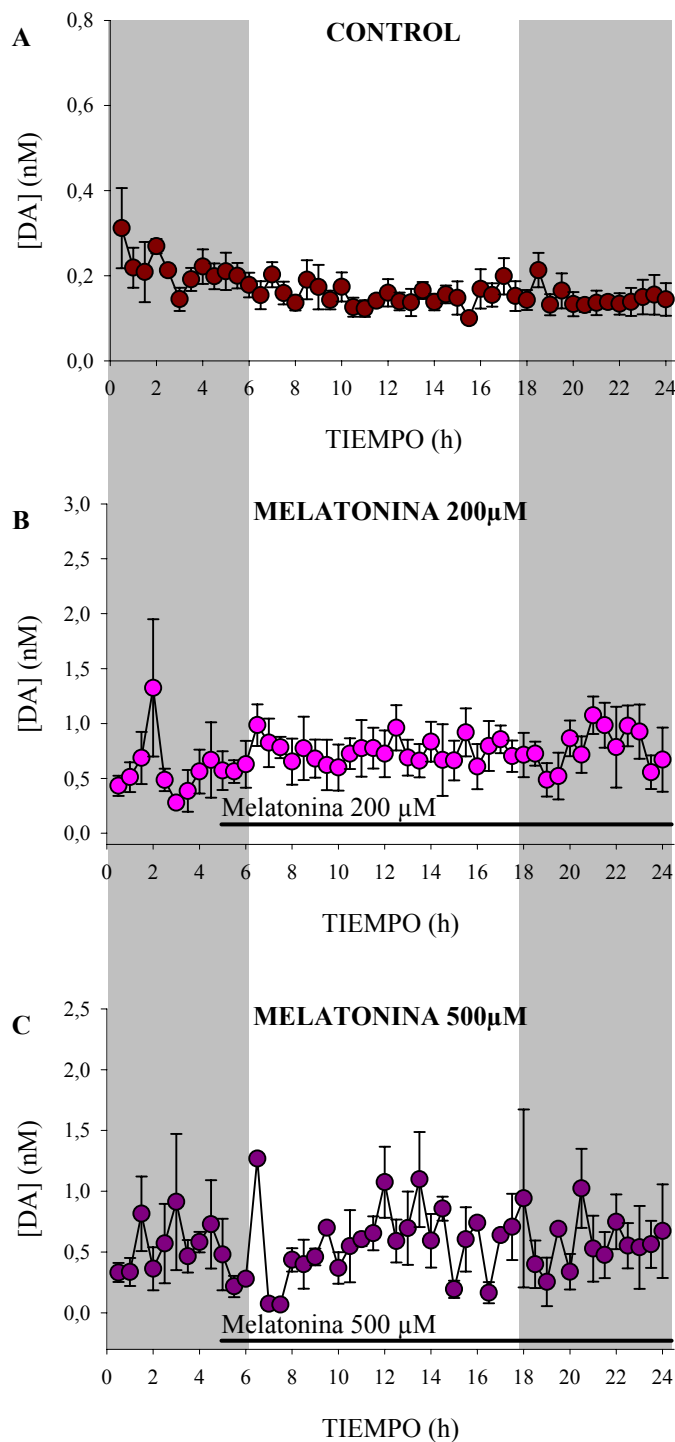


FIGURA 9: Concentraciones extracelulares de dopamina en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz **A)** en condiciones control y durante la perfusión local de melatonina **B)** 200µM y **C)** 500 µM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

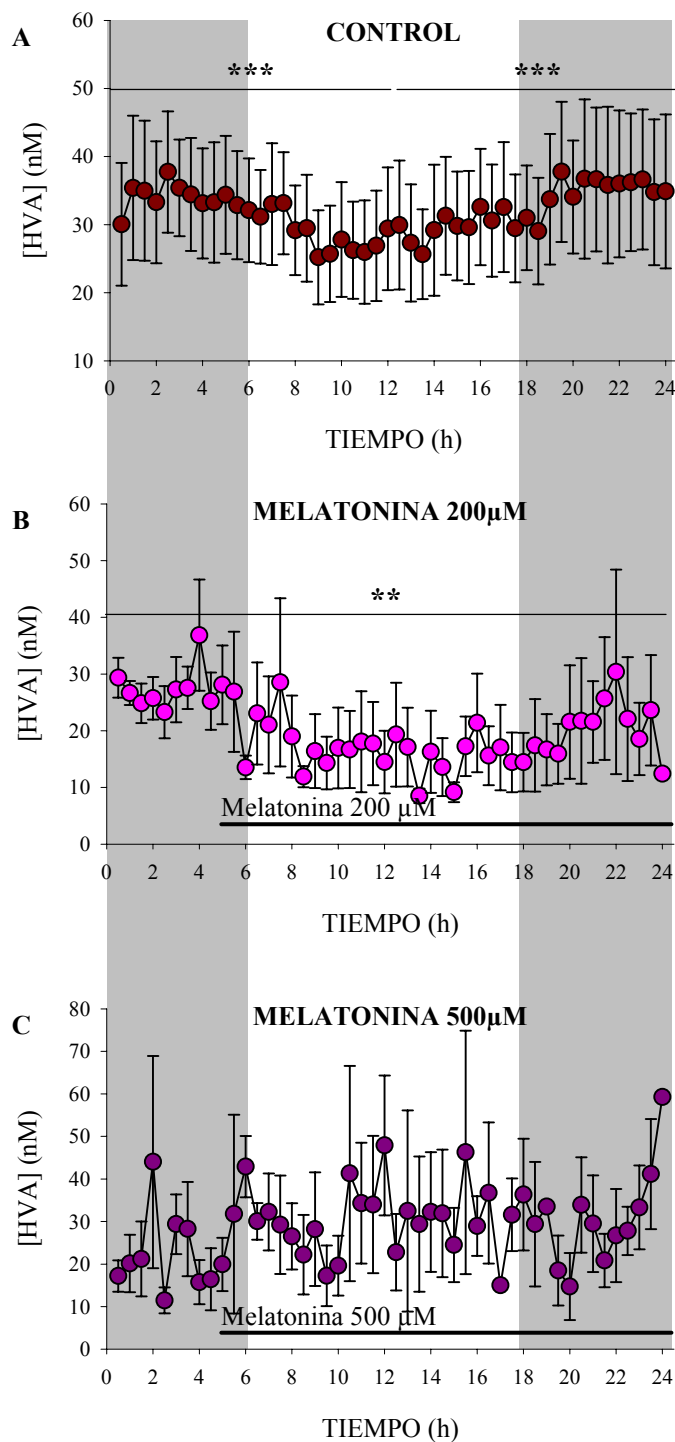


FIGURA 10: Concentraciones extracelulares de HVA en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz **A)** en condiciones control y durante la perfusión local de melatonina **B)** 200µM y **C)** 500 µM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

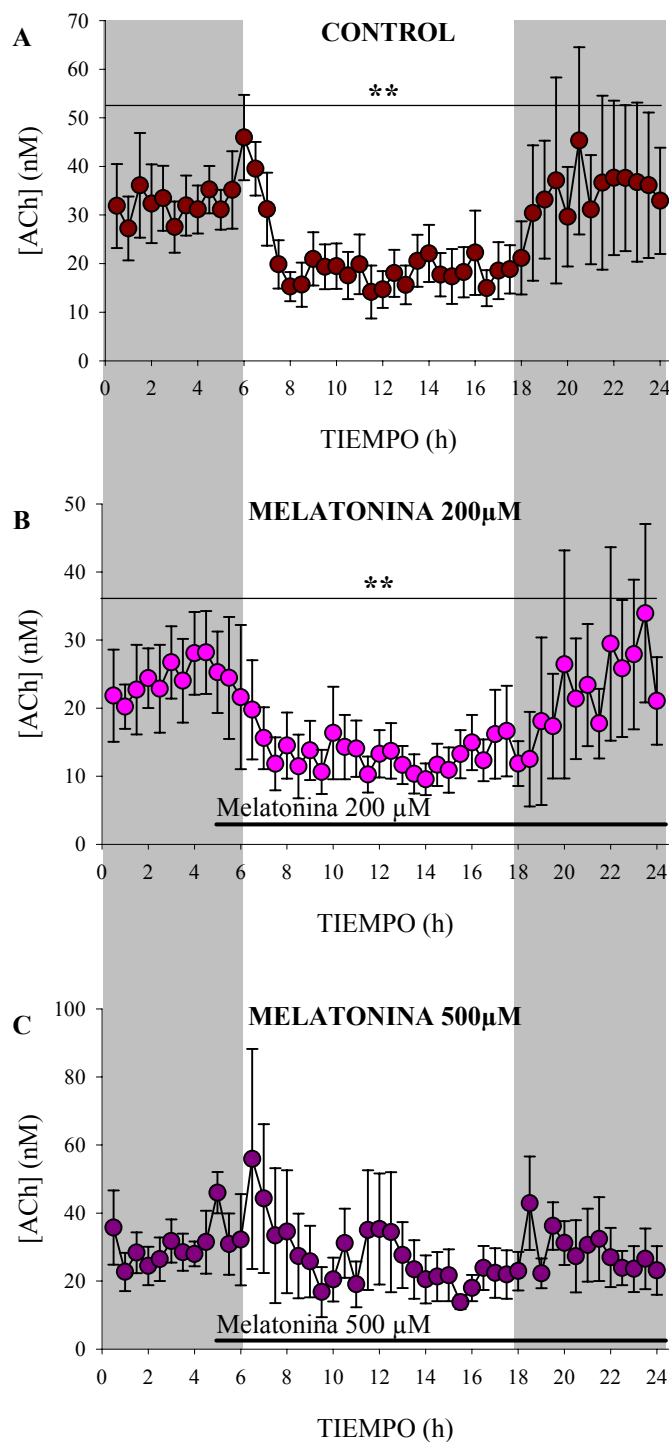


FIGURA 11: Concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz **A)** en condiciones control y durante la perfusión local de melatonina **B)** 200µM y **C)** 500 µM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

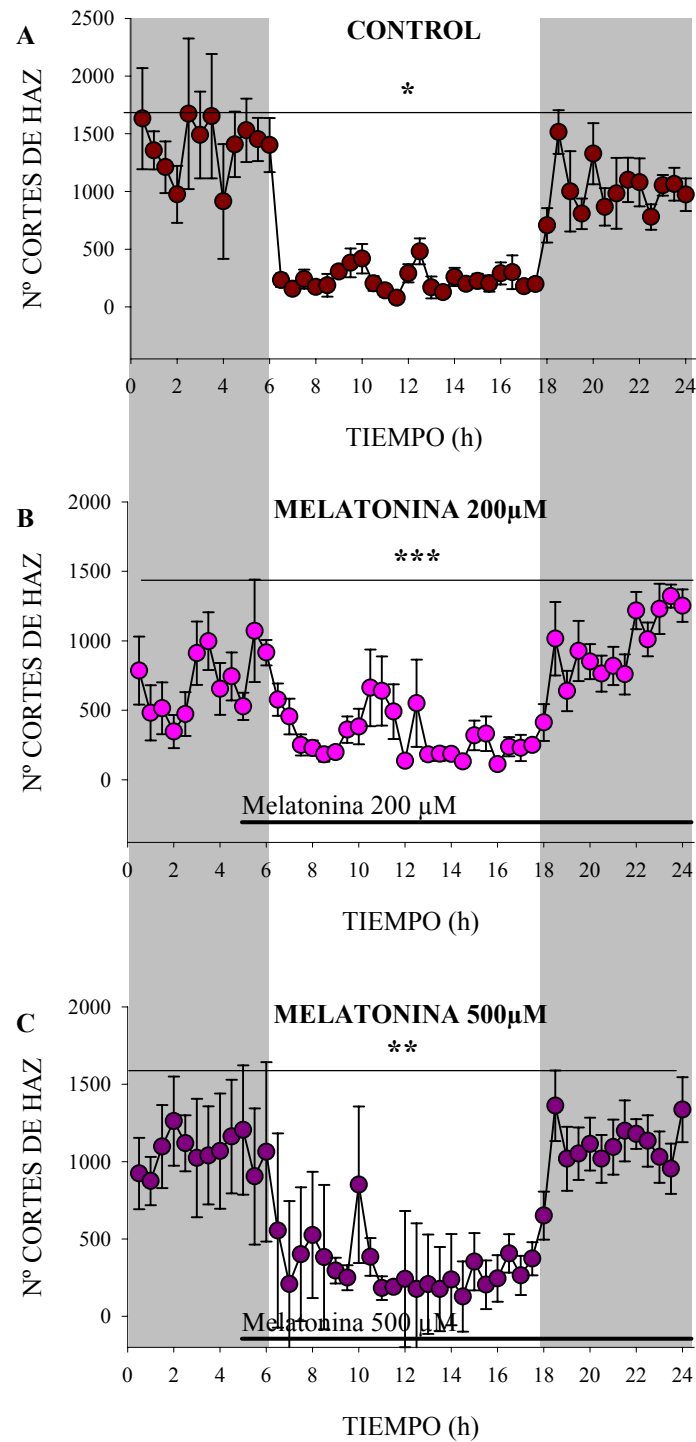


FIGURA 12: Actividad motora de los animales estudiados bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz **A)** en condiciones control y durante la perfusión local de melatonina **B)** 200µM y **C)** 500 µM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

		PARÁMETROS DEL RITMO		
		AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
CONTROL	GLU	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal. Regresiones significativas.		
	DA	-----		
	HVA	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal. Regresiones significativas.		
	ACH	11,21±10,2 nM	27,57±6,9 nM	3,85 radianes
	ACT. MOTORA	493,8±481,8 n.c.h.	649,9±73,65 n.c.h.	3,73 radianes
MELATONINA 200µM	GLU	1,14±0,63 µM	5,37±2,49 µM	4,53 radianes
	DA	-----		
	HVA	0,65±0,33 nM	20,57±6,45 nM	4,35 radianes
	ACH	7,78±4,99 nM	18,16±4,14 nM	3,96 radianes
	ACT. MOTORA	384,8±112,1 n.c.h.	643,9±52,89 n.c.h.	3,86 radianes
MELATONINA 500µM	GLU	-----		
	DA	-----		
	HVA	-----		
	ACH	-----		
	ACT. MOTORA	398,6±523,7 n.c.h.	1001±292,9 n.c.h.	4,57 radianes

TABLA 4: Parámetros de los ritmos circadianos neurotransmisores y de la actividad motora de ratas bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en animales **control** y tras la perfusión de **melatonina 200 µM** y **melatonina 500 µM**. n.c.h.= nº de cortes de haz.

IV. Discusión

La perfusión local de melatonina 200 μ M no rompió los ritmos circadianos de glutamato, HVA y acetilcolina en la corteza prefrontal ni de actividad motora. La dosis de 500 μ M impidió la disminución de las concentraciones extracelulares de glutamato, HVA y acetilcolina durante el periodo de luz, no produciéndose una variación circadiana de las concentraciones extracelulares de estos neurotransmisores. Sin embargo no modificó el ritmo circadiano de actividad motora.

El hecho de que la perfusión continua de melatonina rompa los ritmos circadianos de glutamato, HVA y acetilcolina sugiere que la melatonina regularía, al menos en parte, el ritmo circadiano de neurotransmisores en la corteza prefrontal. Como ya se ha descrito en la introducción general, el núcleo supraquiasmático es el reloj endógeno circadiano principal del organismo. La melatonina es una de las principales salidas de información del núcleo supraquiasmático (Cassone, 1990; Redman et al., 1983; Krause y Dubocovic, 1990), luego es posible que el reloj endógeno regule el ritmo circadiano de neurotransmisores en corteza prefrontal a través de la melatonina. La melatonina podría ejercer esta acción reguladora de los ritmos circadianos de neurotransmisores a través de receptores de membrana. De hecho se han descrito receptores de membrana de melatonina en la corteza prefrontal de ratones (Morgan et al., 1994) y mRNA de receptores de melatonina en corteza prefrontal de humanos (Mazzucchelli et al., 1996). Sin embargo y hasta donde sabemos, no se han descrito receptores de melatonina en corteza prefrontal de rata.

Las concentraciones extracelulares de glutamato son reguladas en gran parte por su recaptura por parte de los astrocitos. Es muy posible que esta pérdida del ritmo circadiano sea debida a la acción de la melatonina sobre la actividad de los astrocitos. Se ha descrito la existencia de receptores de melatonina en astrocitos de pollo (Natesan et al., 2002). Sin embargo, y aun cuando hay evidencias que apoyan la existencia de estos receptores en astrocitos de mamíferos, estos receptores no han sido descritos en la corteza prefrontal de la rata. De hecho, la melatonina ejerce varios efectos sobre los astrocitos tanto a nivel del mantenimiento de su estructura y supervivencia en condiciones de hipoxia y reoxigenación, como sobre su actividad (Martínez y Sáez, 2000; Pei y Cheung, 2003; Baydas et al., 2003). En este último caso, se ha descrito que la perfusión iontoforética de melatonina disminuye la expresión de GFAP y la expresión de esta proteína en astrocitos es un índice de su actividad. Esto último podría interpretarse como que melatonina disminuye la actividad de los astrocitos (Baydas et al. 2003). Disminuir la actividad de los astrocitos, implica disminuir la recaptura de glutamato por parte de estas células. En tanto que en condiciones control, los niveles de melatonina se encuentran elevados en periodo de oscuridad, lo que implica una disminución en la recaptura de glutamato y con ello un aumento de sus concentraciones extracelulares. Y con la llegada de la luz, disminuyen los niveles de melatonina, liberando a los astrocitos de su inhibición, aumentando la recaptura de glutamato y disminuyendo sus concentraciones extracelulares. La perfusión continua de melatonina en la corteza prefrontal mantendría la actividad astrocitaria disminuida en el periodo de luz, impidiendo la disminución de los niveles de glutamato en este periodo y alterando con ello su ritmo circadiano.

Las concentraciones extracelulares de dopamina y sus metabolitos, y acetilcolina son reflejo de la actividad de sus sistemas de neurotransmisión, y/o de la liberación de sus terminales nerviosos. El efecto de la melatonina sobre estos sistemas neurotransmisores estaría relacionado con la regulación de los sistemas de neurotransmisión a nivel de la actividad de sus terminales o de la liberación de sus neurotransmisores o de ambas. Esta

regulación podría realizarse a través de sus receptores específicos pero, como ya hemos detallado anteriormente, todavía no se conoce la posible existencia de receptores de melatonina en la corteza prefrontal.

La regulación de la melatonina sobre el ritmo circadiano de dopamina se realiza principalmente a nivel de su liberación desde los terminales nerviosos, ya que se ha descrito que la melatonina no afecta la tasa de disparo de las neuronas de área tegmental ventral (Millan et al., 2003). Cabe la posibilidad de que la melatonina interactúe con otros receptores, de los cuales no es ligando específico, implicando a otros sistemas de neurotransmisores en esta regulación. De hecho se ha descrito que un agonista de la melatonina actúa antagonizando los receptores 5HT_{2C} e incrementando los niveles de dopamina en la corteza prefrontal (Millan et al., 2003). Los receptores 5-HT_{2C} son muy abundantes en corteza frontal. Quizás la melatonina, profundizada durante el periodo de luz, interactúa con los receptores 5-HT_{2C} y produce un incremento de los niveles de dopamina (y de HVA por tanto) evitando la disminución correspondiente a dicho periodo e impidiendo así la variación circadiana este sistema neurotransmisor.

En el caso de la acetilcolina, la estimulación de receptores 5-HT_{1A} aumenta la liberación de acetilcolina de sus terminales en la corteza prefrontal (Ichikawa et al., 2002a; 2002b). Sin embargo tanto la melatonina como sus agonistas tienen muy poca afinidad por estos receptores serotoninérgicos (Millan et al., 2003). Al contrario que con la dopamina, no parece que el sistema serotoninérgico sea el encargado de mediar los efectos de la melatonina sobre la acetilcolina. Por otro lado, se ha sugerido que la melatonina modifica la transmisión acetilcolinérgica en varias estructuras cerebrales, entre ellas la retina, el hipotálamo o el núcleo accumbens (Paredes et al., 1999). En el núcleo accumbens, la perfusión local de melatonina aumenta las concentraciones extracelulares de acetilcolina, estos resultados son similares a los que obtenemos en la corteza prefrontal. Sin embargo, el mecanismo por el cual la melatonina actúa sobre el sistema colinérgico, en ambos casos, no está claro. Lo que sí se ha sugerido es que el ritmo circadiano es endógeno, regulado por el núcleo supraquiasmático, ya que se mantiene en condiciones de oscuridad constante (Kametani y Kawamura, 1991). Es posible que el núcleo supraquiasmático regule el ritmo circadiano de acetilcolina a través de la melatonina, regulando su liberación en la corteza prefrontal, ya que la perfusión local de esta hormona altera su ritmo circadiano.

La melatonina también podría regular los ritmos circadianos de estos sistemas neurotransmisores a través de sus efectos sobre el sistema GABAérgico, ya que las neuronas GABA en la corteza prefrontal son principalmente interneuronas, y regulan la liberación de las otras terminales nerviosas de esta estructura. En condiciones normales el número de receptores GABA-A en membranas de corteza muestra un ritmo circadiano con un máximo de número de sitios de unión en el periodo de luz (Acuña-Castroviejo, 1986; Golombek et al., 1996). Sin embargo, en animales pinealectomizados, el número de sitios de unión GABA-A en membranas de corteza cerebral durante el periodo de oscuridad aumenta, perdiéndose su ritmo circadiano (Acuña-Castroviejo, 1986; Golombek et al., 1996). La inyección de melatonina revierte los efectos de la pinealectomía (Rosestein y Cardinali, 1990; Golombek et al., 1996). Se ha propuesto que la melatonina regula el número de sitios de unión mediante la modulación alostérica de alguno de los componentes del receptor GABA-A. Los receptores GABA-A se encuentran localizados postsinápticamente, en las terminales dopaminérgicas y colinérgicas (entre otras) y la acción del GABA uniéndose a estos receptores inhibe la liberación de los neurotransmisores de sus terminales. La perfusión de melatonina durante el periodo de luz disminuiría el número de sitios de unión de GABA y con ello la inhibición de

los terminales, aumentando la liberación de los neurotransmisores durante el periodo de luz y perdiéndose su ritmo circadiano.

La perfusión local de melatonina en la corteza prefrontal no modificó el ritmo circadiano de actividad motora a ninguna de las dosis. Estos resultados sugieren que este área no está relacionada con la regulación del ritmo circadiano de actividad motora espontánea. Sin embargo la inyección sistémica diaria de melatonina sincroniza el ritmo circadiano de actividad motora, modificando su fase según el momento del día en que se realiza la inyección (Redman et al. , 1983; Cassone, 1990). Se ha mostrado que la melatonina realiza esta sincronización actuando sobre el núcleo supraquiasmático ya que sincroniza la actividad de este núcleo (Cassone, 1990) y el ritmo circadiano de la actividad motora está bajo el control directo del núcleo supraquiasmático (Meijer y Rietveld, 1989; Scharz y Zimmerman, 1990). Además se ha mostrado que la integridad del núcleo supraquiasmático es necesaria para que la melatonina pueda sincronizar el ritmo circadiano de actividad motora (Cassone et al., 1988; Pitrosky et al., 1999). Esta sincronización del ritmo circadiano de actividad motora se mantiene en condiciones de luz constante y es dependiente de la dosis de melatonina utilizada (Golombek et al., 1996) y parece depender de la interacción de la melatonina con sitios de unión específicos en el núcleo supraquiasmático (Cassone et al., 1986). De hecho se han descrito receptores de melatonina en este núcleo en varias especies de vertebrados entre ellas ratas, ratones y humanos (Morgan et al., 1994; Drew et al, 2001).

Bloque Experimental 5

Efecto del proceso de envejecimiento sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en Corteza Prefrontal y de actividad locomotora de la rata despierta. Estudio comparativo con ganglios basales.

I. Introducción

El proceso de envejecimiento produce cambios en la amplitud y sincronía de los ritmos circadianos. Esto conlleva cambios en el sueño, en el estado de alerta, la temperatura corporal, la secreción hormonal (Savaskan, 2002) y algunos procesos cognitivos (Muir et al., 1997; Nieoullon, 2002; West et al., 2002). Estos cambios en los ritmos circadianos están directamente relacionados con una disminución en la actividad de las neuronas del núcleo supraquiasmático, el reloj circadiano de organismo, (Wise et al 1988; Pandi-Perumal et al, 2002) y con alteraciones en su sincronización por la luz y otros Zeightgebers (Turek et al., 1993). Además la melatonina circulante está muy disminuída en animales viejos (Savasnka, 2002).

Teniendo en cuenta que el núcleo supraquiasmático inerva la corteza prefrontal (Sylvester et al., 2002) y que la melatonina regula los ritmos circadianos de neurotransmisores en la corteza prefrontal (ver bloque 4), es muy posible que la regulación de los ritmos circadianos de neurotransmisores en este área estén modificados con la edad. De hecho, en individuos de edad avanzada se han descrito alteraciones de funciones cognitivas relacionadas con la función de la corteza prefrontal, como son la memoria de trabajo o procesos atencionales (Burk et al., 2002; Nieoullon, 2002; West et al., 2002). Algunos trabajos relacionan estas alteraciones con modificaciones de los sistemas colinérgico y dopaminérgico de la corteza prefrontal (Gallager y Colombo 1995; Burk et al., 2002; Phillips et al., 2004).

Con el envejecimiento, además, muchos sistemas de neurotransmisores se ven modificados. En la corteza prefrontal, el sistema glutamatérgico muestra modificaciones en la recaptura de su neurotransmisor y una disminución en el número de los receptores NMDA (Segovia et al., 2001). El sistema colinérgico también presenta cambios que se han relacionado con la pérdida de neuronas colinérgicas en el telocéfalo basal, área que inerva la corteza prefrontal (Stoess et al., 1989). Por ejemplo la liberación estimulada por K^+ de acetilcolina en la corteza de animales viejos es menor (Herzog et al., 2003) y el número de receptores muscarínicos también está disminuido (Rehman y Masson, 2001).

El envejecimiento produce cambios en los diferentes sistemas dopaminérgicos a lo largo del sistema nervioso. Estos cambios consisten en modificaciones tanto en su metabolismo (Rehman y Masson, 2001) como en su actividad (Joyce, 2001; Stanford et al., 2001). El sistema dopaminérgico inerva desde áreas mesencefálicas a la corteza prefrontal a través de la vía mesocortical, y está implicado en la regulación de funciones cognitivas (Nieoullon, 2002; Phillips 2004) que están deterioradas tanto en el envejecimiento normal como en enfermos de Parkinson y Alzheimer (Nieoullon, 2002). Del Arco et al (2001) han mostrado recientemente que la liberación de dopamina en corteza prefrontal inducida por estrés es menor en ratas viejas. Los sistemas dopaminérgicos mesencefálicos inervan también al estriado a través de la vía nigroestriatal y al núcleo accumbens a través de la vía mesolímbica, que están relacionadas con funciones motoras (Armengol, 1998; Artigas, 1998) y límbicas (Artigas, 1998) respectivamente, y que también muestran deterioro en el proceso de envejecimiento normal y patológico (Muir et al., 1997; Hoehn y Yahr, 1998; Nieoullon, 2002).

El objetivo de este bloque experimental fue el estudio del efecto del proceso de envejecimiento sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en la Corteza Prefrontal y de la actividad locomotora. También se estudió el efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en estriado y núcleo accumbens:

5.1. Estudio del efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en la Corteza Prefrontal en ratas de edad joven (2-4 meses) y de edad vieja (23-25 meses).

5.2. Estudio del efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en el Estriado en ratas de edad joven (2-4 meses) y de edad vieja (23-25 meses).

5.3. Estudio del efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadiano de glutamato, dopamina y acetilcolina en el Núcleo Accumbens en ratas de edad joven (2-4 meses) y de edad vieja (23-25 meses).

5.4. Estudio del efecto del envejecimiento sobre el ritmo circadiano de actividad motora en ratas de edad joven (2-4 meses) y de edad vieja (23-25 meses)

II. Material y Métodos

En este bloque experimental se utilizaron ratas wistar macho jóvenes, de 2-4 meses y 250-350 gramos de peso, y viejas, de 23-25 meses y 450-470 gramos de peso. Los animales fueron mantenidos en un ciclo 12h oscuridad/12h luz, temperatura constante de 24° C y comida y bebida *ad libitum*.

Se realizaron modificaciones en las medidas de las cánulas guía, la cánulas de microdiálisis y en la coordenadas estereotáxicas según la estructura cerebral bajo estudio. Las modificaciones fueron las siguientes:

1) Las cánulas guía de los implantes midieron 8 mm de longitud en los experimentos de corteza prefrontal y 10 mm de longitud en el caso de estriado y núcleo accumbens. Los fiadores fueron de 8, 2 mm en el caso de corteza prefrontal y 10.5 mm en el caso de estriado y núcleo accumbens.

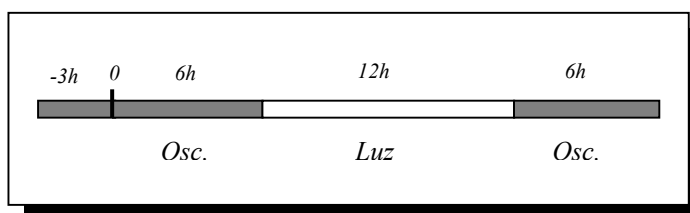
2) Los animales jóvenes se colocan en el aparato estereotáxico pinzando el maxilar superior 4 mm por debajo de la línea interaural y los animales viejos 5 mm por debajo de la línea interaural. Esta modificación se determinó de manera experimental para corregir las diferencias de coordenadas entre ratas jóvenes y viejas debido al mayor tamaño de cerebro y cráneo de estas últimas. Las coordenadas estereotáxicas según el atlas de König y Klippel (1967) para cada una de las áreas cerebrales estudiadas fueron: 3.6 mm rostral y 0.9 mm lateral desde bregma y 0.5 mm ventral desde duramadre para corteza prefrontal, 0.6 mm rostral y 2.5 mm lateral desde Bregma y 2.8 mm ventral desde duramadre para estriado y 1.6 mm rostral y 1.6 mm lateral desde Bregma y 2.8 mm ventral desde dura madre para núcleo accumbens.

3) En las cánulas de microdiálisis se modifica la longitud de la membrana que es de 4 mm para corteza prefrontal y estriado, y de 2.5 para núcleo accumbens; y la longitud de la pieza de

26 ga que queda fuera del tope de polietileno, ésta es de 15,5 mm para corteza prefrontal, de 18.5 mm para estriado y de 19.5 mm para núcleo accumbens.

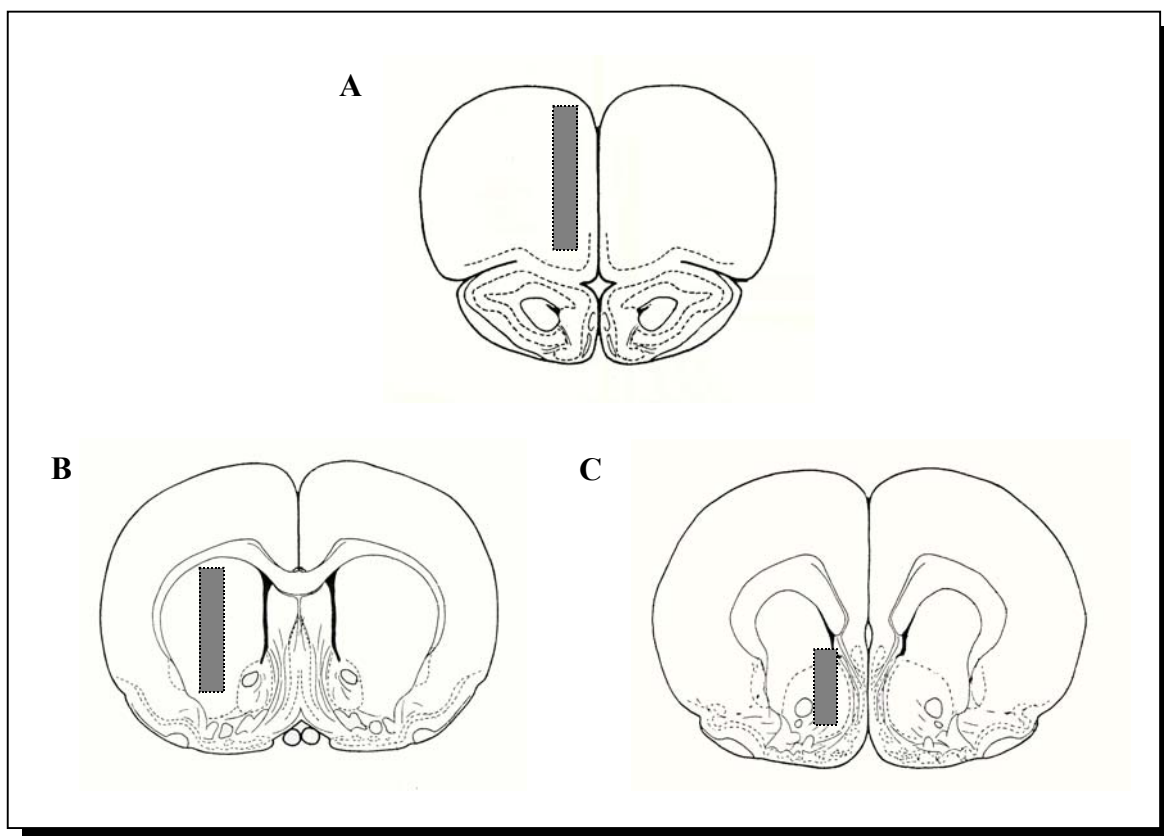
10-15 días tras la implantación estereotáxica de las cánulas guía, se llevaron a cabo los experimentos de microdiálisis en la rata despierta en los que se perfundió LCRs, que contenía nomifensina 5 μM y neostigmina 1 μM para elevar los niveles basales de dopamina y acetilcolina, a un flujo de perfusión de 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Tras tres horas perfusión, en que se estabilizan las concentraciones extracelulares de neurotransmisores, se recogieron muestras cada 30 minutos durante 24 horas bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz.

Protocolo del experimento:



La detección y análisis de glutamato, dopamina, HVA y acetilcolina, así como la medida de la actividad motora, se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado general de material y métodos.

Al finalizar los experimentos se realizó un examen histológico, según lo descrito en el material y métodos general, para comprobar la correcta localización de la cánula de microdiálisis. La siguiente figura ilustra un ejemplo de la localización de la membrana en cada una de las tres estructuras cerebrales, (A) Corteza Prefrontal, (B) Estriado y (C) Núcleo Accumbens según el atlas de Köning y Klippel, 1967:



Las concentraciones obtenidas se analizaron estadísticamente a través de método de Cosinor y/o un ANOVA seguido de un análisis de regresión (ver capítulo de material y métodos general en esta misma tesis doctoral).

Los niveles totales de la variable fueron calculados como la media de las concentraciones extracelulares durante las 24 horas de experimento. Los niveles en el primer periodo de oscuridad se calcularon como la media de las concentraciones extracelulares desde la hora 0 del experimento a la hora 6, los niveles en el periodo de luz como la media de las concentraciones entre la hora 6.5 hasta la hora 18 y los niveles del segundo periodo de oscuridad como la media de las concentraciones entre las horas 18.5 a la hora 24 de experimento. Las comparaciones de los niveles entre grupos se realizaron mediante una t-Student.

III. Resultados

5.1. Efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en la Corteza Prefrontal

Las concentraciones extracelulares basales en la corteza prefrontal en el grupo de ratas jóvenes fueron: Glutamato = $4,24 \pm 1,32 \mu\text{M}$; dopamina = $1,09 \pm 0,10 \text{ nM}$; HVA = $46,93 \pm 13,95 \text{ nM}$; acetilcolina = $34,96 \pm 3,82 \text{ nM}$. En el grupo de ratas viejas las concentraciones extracelulares basales fueron: Glutamato = $6,67 \pm 2,04 \mu\text{M}$; dopamina = $0,83 \pm 0,21 \text{ nM}$; HVA = $46,44 \pm 6,44 \text{ nM}$; acetilcolina = $22,67 \pm 2,48 \text{ nM}$.

Las concentraciones extracelulares de **glutamato** en la corteza prefrontal de ratas jóvenes muestra un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=6$, $p<0,05$) de amplitud 12,5 % de las concentraciones basales ($4,24 \pm 1,32 \mu\text{M}$), mesor $2,99 \pm 0,51 \mu\text{M}$ y acrofase 15 horas 46 minutos 32 segundos (Figura 13-A, tabla 5). Las concentraciones extracelulares de glutamato en la corteza prefrontal de ratas viejas no se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=7$) aunque 6 de los 7 animales estudiados muestran un ritmo circadiano que sí se ajusta a dicho modelo. Sin embargo las concentraciones extracelulares de glutamato disminuyen un 44,23% ($3,72 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales ($6,67 \pm 2,04 \mu\text{M}$) con el paso al periodo de luz ($n=7$, $p<0,001$) pero no aumentan durante el segundo periodo de oscuridad ($n=7$, $p>0,05$) (Figura 13-B).

El ritmo circadiano de glutamato descrito en corteza prefrontal se pierde en ratas viejas (Figura 14-A, tabla 5).

Los niveles de glutamato en la corteza prefrontal no muestran diferencias en entre los dos grupos ni los totales, ni los separados según el periodo del ciclo oscuridad/luz (Figura 14-B).

Las concentraciones extracelulares de **dopamina** en corteza prefrontal de ratas jóvenes no se ajusta a un modelo sinusoidal, aunque en 2 de los 6 animales estudiados se ajusta a un modelo sinusoidal. Sus concentraciones extracelulares disminuyen un 30,28% ($0,76 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($1,09 \pm 0,10 \text{ nM}$) ($n=6$, $p<0,001$) pero no aumentan en el segundo periodo de oscuridad ($n=6$, $p>0,05$) (Figura 15-A). Del mismo modo, las concentraciones extracelulares de dopamina en corteza prefrontal de ratas viejas no se ajustan a un modelo sinusoidal, aunque 2 de los 8 animales estudiados se ajustan a una sinusoidal. Sus concentraciones extracelulares disminuyen un 8,43% ($0,63 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($0,83 \pm 0,21 \text{ nM}$) ($n=8$, $p<0,01$) pero no aumentan en el segundo periodo de oscuridad

(n=8, p>0,05) (Figura 15-B). La dopamina no muestra un ritmo circadiano en ninguno de los grupos.

No se encuentran diferencias en los niveles de dopamina en corteza prefrontal entre jóvenes y viejas ni estudiados como media de todo el experimento, ni separados por periodos del ciclo oscuridad/luz. (Figura 16).

Las concentraciones extracelulares del metabolito de la dopamina, **HVA**, en la corteza prefrontal de ratas jóvenes, mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal (n=6, p<0,05) de amplitud 14,51% de las concentraciones basales (46,93±13,95 nM), mesor 39,31±11,35 nM y acrofase 15 horas 44 minutos 14 segundos (Figura 17-A, tabla 6). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares de HVA mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal (n=6, p<0,05) de amplitud 10,77% de las concentraciones basales (46,44±6,44 nM), mesor 45,67±5,55 y acrofase 16 horas 59 minutos 52 segundos (Figura 17-B, tabla 6).

El ritmo circadiano de HVA en corteza prefrontal no se perdió en ratas viejas y no se encontraron diferencias entre ambos ritmos. Ni el test del mesor, ni el test conjunto de la amplitud-acrofase mostraron diferencias (p>0,05) (Figura 18-A, tabla 6).

Los niveles de HVA en la corteza prefrontal no son distintos en ratas jóvenes y ratas viejas, ni estudiados durante todo el experimento, ni separados por periodos del ciclo oscuridad/luz (Figura 18-B).

Las concentraciones extracelulares de **acetilcolina** en la corteza prefrontal de ratas jóvenes mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal (n=7, p<0,05) de amplitud 26,66% de las concentraciones basales (34,96±3,82 nM), mesor 26,72±4,71 nM y acrofase 15 horas 23 minutos 37 segundos (Figura 19-A, tabla 7). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal muestran un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal (n=7, p<0,01) de amplitud 23,07% de las concentraciones basales (22,67±2,48 nM), mesor 15,25±3,11 nM y acrofase 16 horas 43 minutos 49 segundos (Figura 19-B, tabla 7). Los niveles totales de acetilcolina en corteza prefrontal son menores en ratas viejas (p<0,05).

El ritmo circadiano de acetilcolina en la corteza prefrontal no se pierde en ratas viejas. Al comparar ambos ritmos no se observan diferencias ni en el test del mesor ni en el test conjunto de la amplitud y la acrofase (p>0,05) (Figura 20-A, tabla 7). Sin embargo cuando comparamos los niveles por periodos del ciclo oscuridad/luz se observa que los niveles de acetilcolina en ratas viejas son menores en los periodos de oscuridad (p<0,05) no habiendo diferencias en el periodo de luz (Figura 20-B). Lo que sugiere que la amplitud del ritmo circadiano de acetilcolina en ratas viejas es menor.

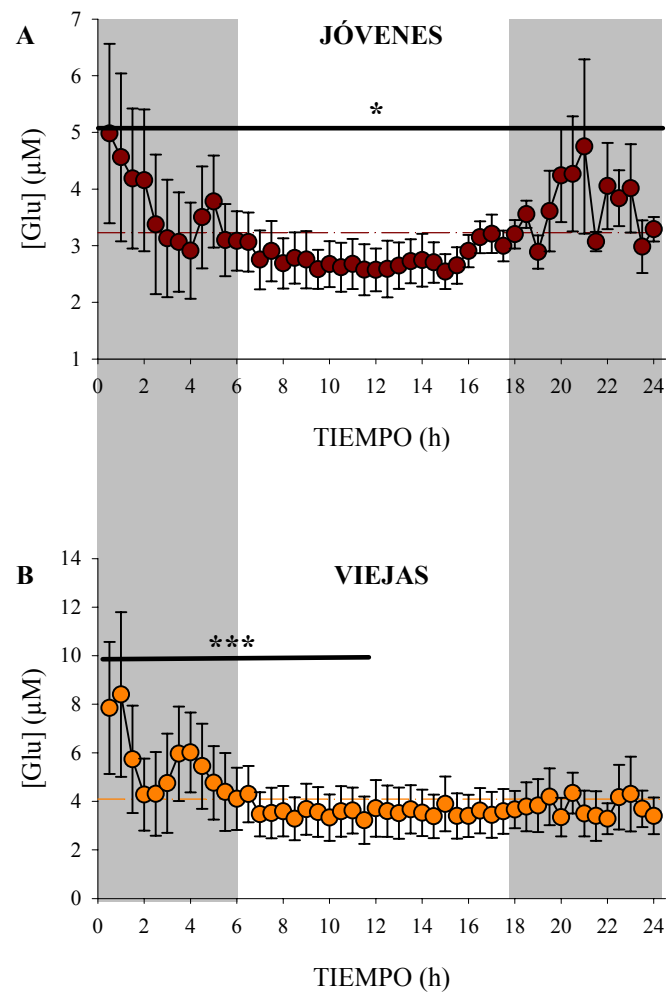


FIGURA 13: Concentraciones extracelulares de glutamato en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

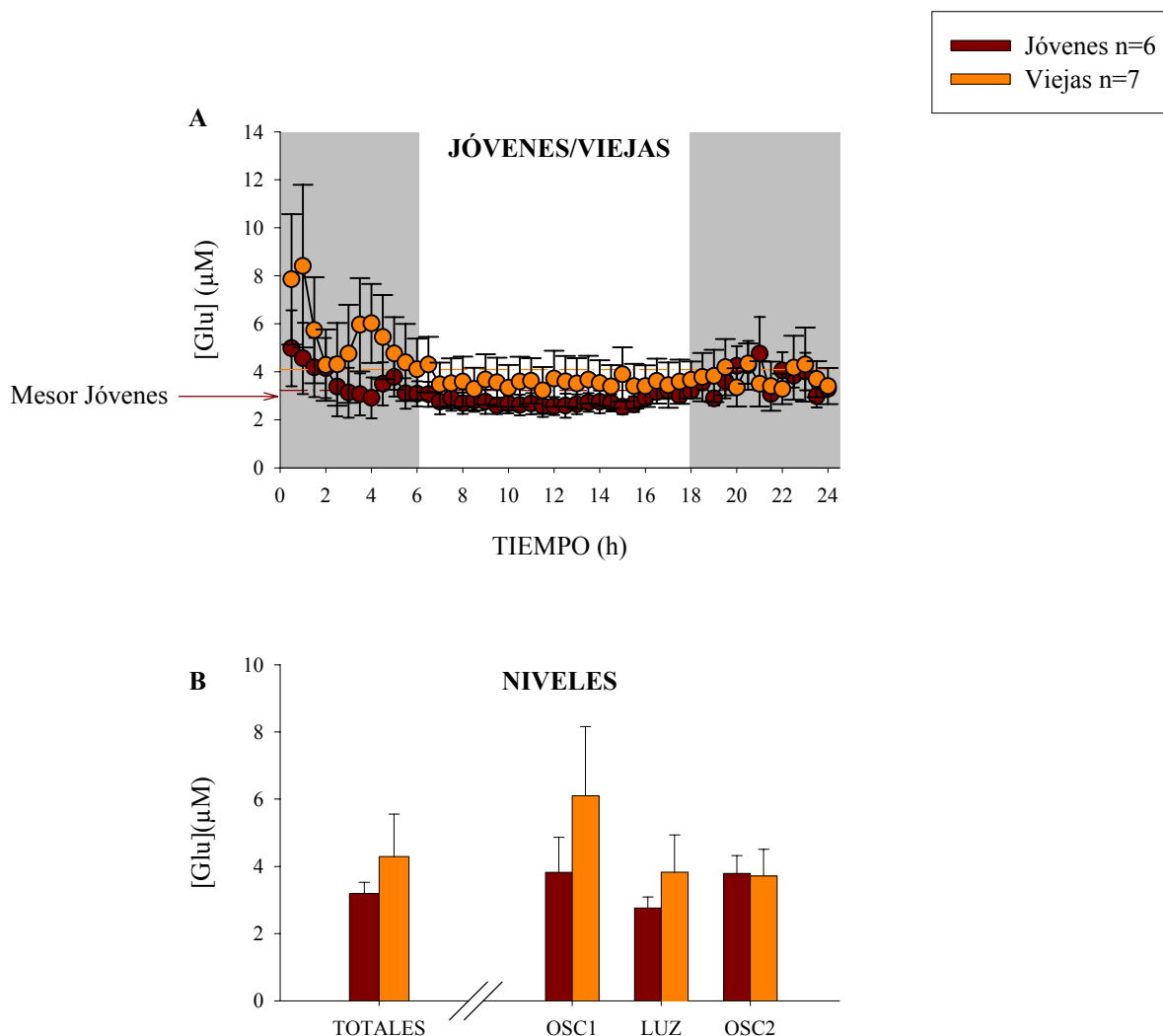


FIGURA 14: Comparación de las concentraciones extracelulares de glutamato en la corteza prefrontal: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de glutamato: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,01.

PARÁMETROS DEL RITMO			
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
Glu Jóvenes	0,53±0,11 µM	2,99±0,51 µM	4,13 radianes
Glu Viejas	-----		

TABLA 5: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de glutamato en la corteza prefrontal de ratas jóvenes y viejas.

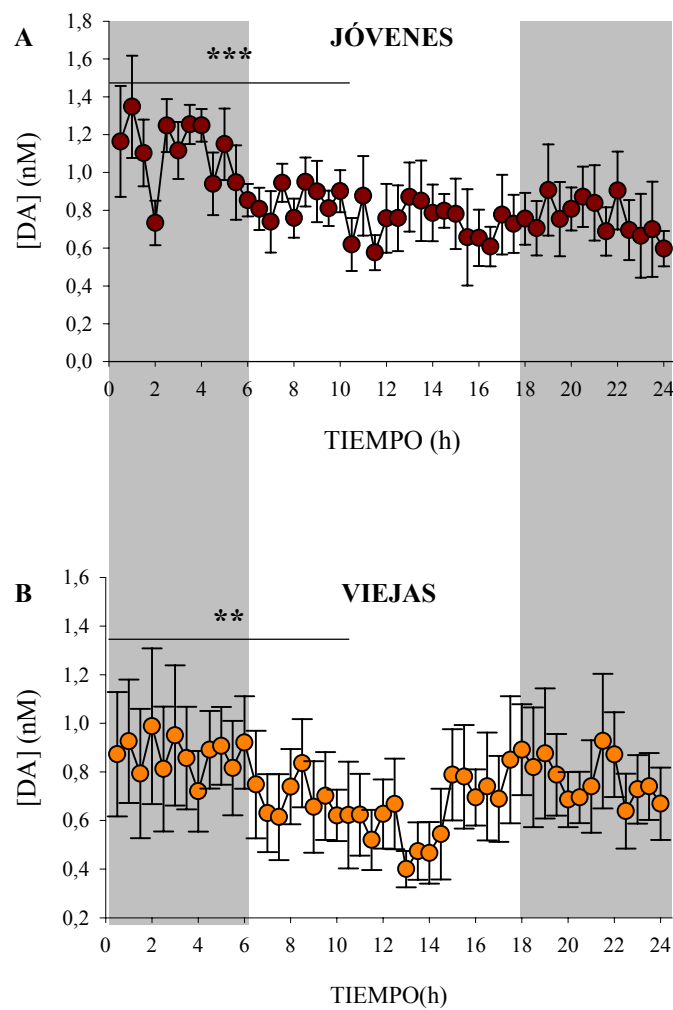


FIGURA 15: Concentraciones extracelulares de dopamina en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

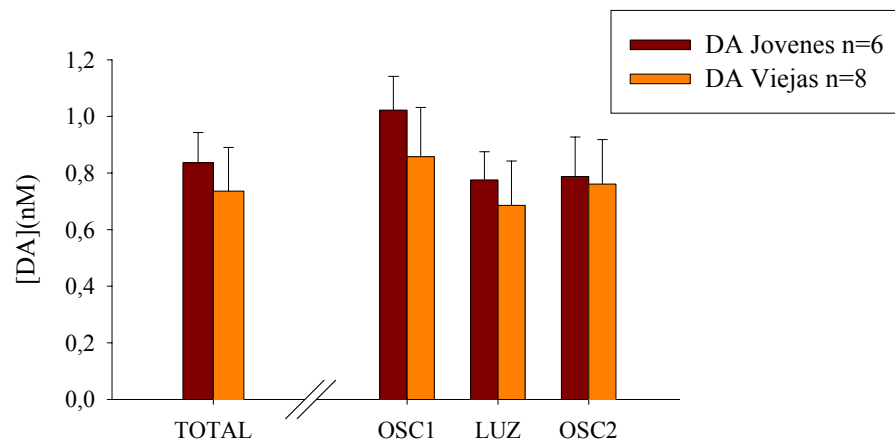


FIGURA 16: Comparación de las medias concentraciones extracelulares de dopamina en la corteza prefrontal: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

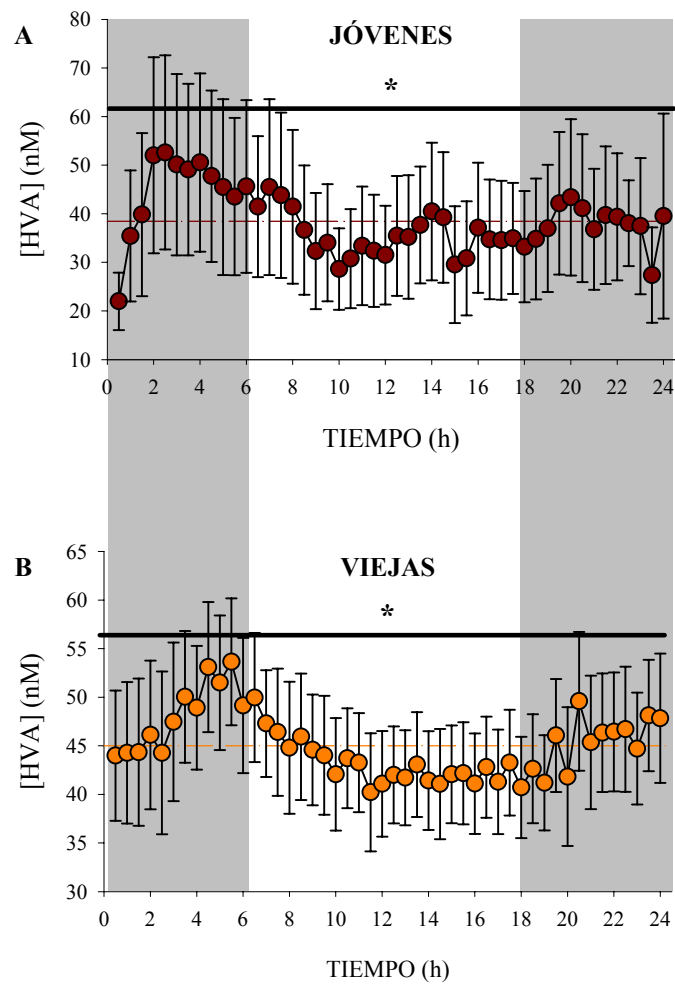


FIGURA 17: Concentraciones extracelulares de HVA en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

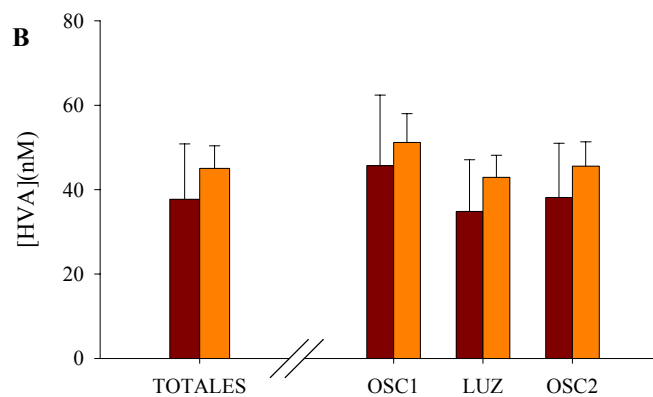
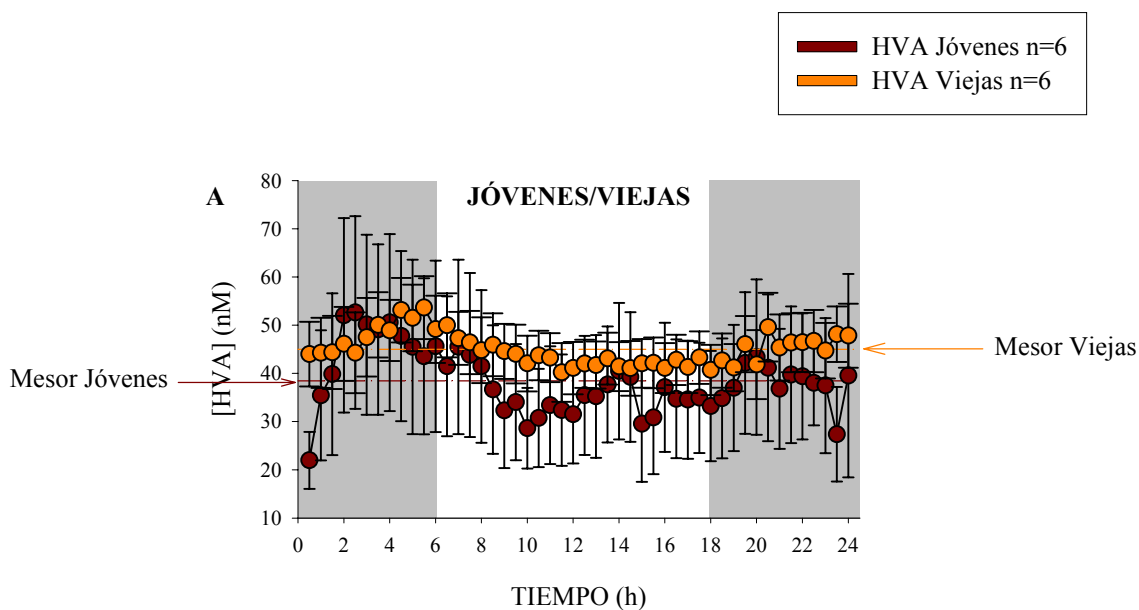


FIGURA 18: Comparación de las concentraciones extracelulares de HVA en la corteza prefrontal: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de HVA: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

		PARÁMETROS DEL RITMO		
		AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
HVA Jóvenes		6,81±6,66 nM	39,3±11,35 nM	4,12 radianes
HVA Viejas		5,00±4,2 nM	45,67±5,55 nM	4,45 radianes

TABLA 6: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de HVA en la corteza prefrontal de ratas jóvenes y viejas.

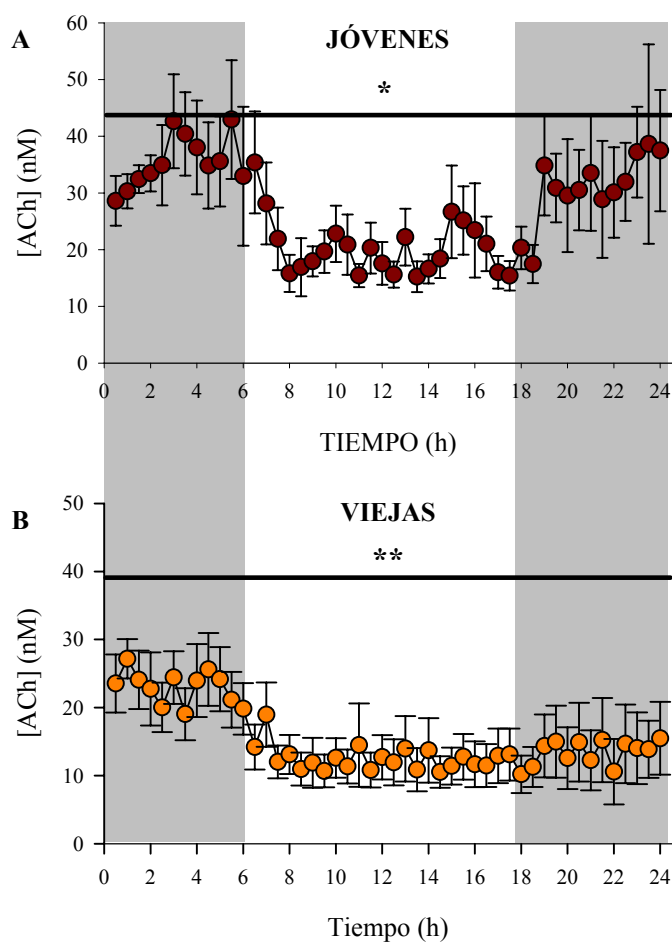


FIGURA 19: Concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses).
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

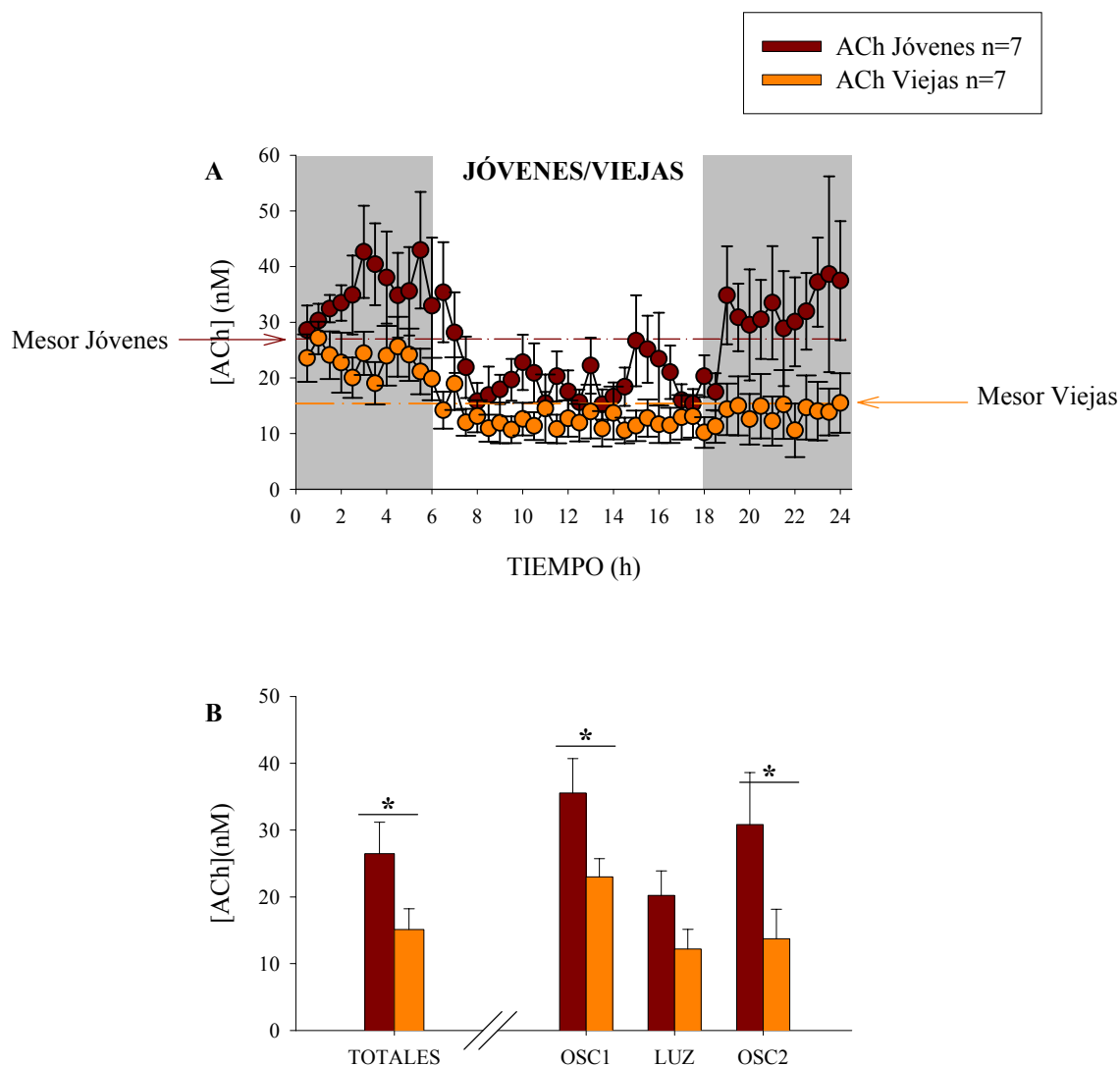


FIGURA 20: Comparación de las concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de acetilcolina: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

	PARÁMETROS DEL RITMO		
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
ACh Jóvenes	9,31±5,2 nM	26,72±4,71 nM	4,03 radianes
ACh Viejas	5,23±3,24 nM	15,25±3,11 nM	4,38 radianes

TABLA 7: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal de ratas jóvenes y viejas.

5.2. Efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en el Estriado.

Las concentraciones extracelulares basales en estriado en el grupo de ratas jóvenes fueron: Glutamato = $3,51 \pm 0,70$ μM ; dopamina = $2,73 \pm 0,31$ nM; HVA = $650,55 \pm 81,14$ nM; acetilcolina = $22,50 \pm 5,71$ nM. En el grupo de ratas viejas las concentraciones extracelulares basales fueron: Glutamato = $4,49 \pm 1,66$ μM ; dopamina = $1,19 \pm 0,45$ nM; HVA = $170,19 \pm 78,60$ nM; acetilcolina = $20,15 \pm 3,93$ nM.

Las concentraciones extracelulares de **glutamato** en el estriado de ratas jóvenes mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=7$, $p<0,01$) de amplitud 26,50% de las concentraciones basales ($3,51 \pm 0,70$ μM), mesor $2,41 \pm 0,5$ μM y acrofase 15 horas 51 minutos 7 segundos (Figura 21-A, tabla 8). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares en estriado no se ajustan a un modelo sinusoidal ($n=6$) aunque 6 de los 6 animales estudiados muestran un ritmo circadiano que sí se ajusta a dicho modelo. Sin embargo las concentraciones extracelulares de glutamato disminuyen un 40,31% ($2,19$ μM) de las concentraciones basales ($4,49 \pm 1,66$ μM) con el paso al periodo de luz ($n=6$, $p<0,001$) pero no aumentan durante el segundo periodo de oscuridad (Figura 21-B).

El ritmo circadiano de glutamato se pierde en ratas viejas (Figura 22-A, tabla 8).

Los niveles de glutamato en estriado no son diferentes en ratas jóvenes y viejas, ni los totales, ni separados por periodos del ciclo oscuridad/luz (Figura 22-B).

Las concentraciones extracelulares de **dopamina** en el estriado de ratas jóvenes mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=7$, $p<0,01$) de amplitud 22,71% de las concentraciones basales ($2,73 \pm 0,31$ nM), mesor $1,70 \pm 0,07$ nM y acrofase 17 horas 11 minutos 19 segundos (Figura 23-A, tabla 9). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares de dopamina no mostraron un ritmo circadiano que se ajuste a un modelo sinusoidal ($n=6$), ni disminuyeron ni aumentaron con los cambios del periodo de oscuridad/luz (Figura 23-B).

El ritmo circadiano de dopamina descrito en estriado se pierde en ratas viejas (Figura 24-A, tabla 9).

Los niveles de dopamina en el estriado fueron más bajos en ratas viejas tanto los totales ($p<0,001$), como en los periodos de oscuridad ($p<0,01$) y en el periodo de luz ($p<0,001$) cuando se comparan los periodos por separado (Figura 24-B).

Las concentraciones extracelulares del metabolito de la dopamina, **HVA**, en el estriado de ratas jóvenes, mostraron, al igual que la dopamina, un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=7$, $p<0,01$) de amplitud 14,40% de las concentraciones basales ($650,55 \pm 81,14$ nM), mesor $559,1 \pm 67,68$ nM y acrofase 17 horas 48 minutos (Figura 25-A, tabla 10). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares de HVA en estriado no mostraron un ritmo circadiano que se ajuste a un modelo sinusoidal ($n=6$), ni disminuyeron ni aumentaron con los cambios de periodo del ciclo oscuridad/luz (Figura 25-B).

El ritmo circadiano de HVA en estriado se pierde en ratas viejas (Figura 26-A, tabla 10).

Los niveles de HVA en el estriado son menores en ratas viejas ($p < 0,001$) tanto en los periodos de oscuridad ($p < 0,001$) como en el periodo de luz ($p < 0,001$) (Figura 26-B).

Las concentraciones extracelulares de **acetilcolina** en estriado no muestran un ritmo circadiano que se ajuste a un modelo sinusoidal ni en ratas jóvenes ($n=7$), ni en ratas viejas ($n=6$) aunque 6 de los 7 y 5 de los 6 animales estudiados en cada caso muestran un ritmo circadiano que sí se ajusta a dicho modelo. Además sus concentraciones extracelulares no disminuyen ni aumentan con los cambios de periodo del ciclo oscuridad/luz en ninguno de los dos grupos (Figura 27-A y B). La acetilcolina no muestra un ritmo circadiano en el estriado.

Los niveles de acetilcolina en estriado no son diferentes en ratas jóvenes y viejas, ni los totales, ni separados por periodos del ciclo oscuridad/luz (Figura 28).

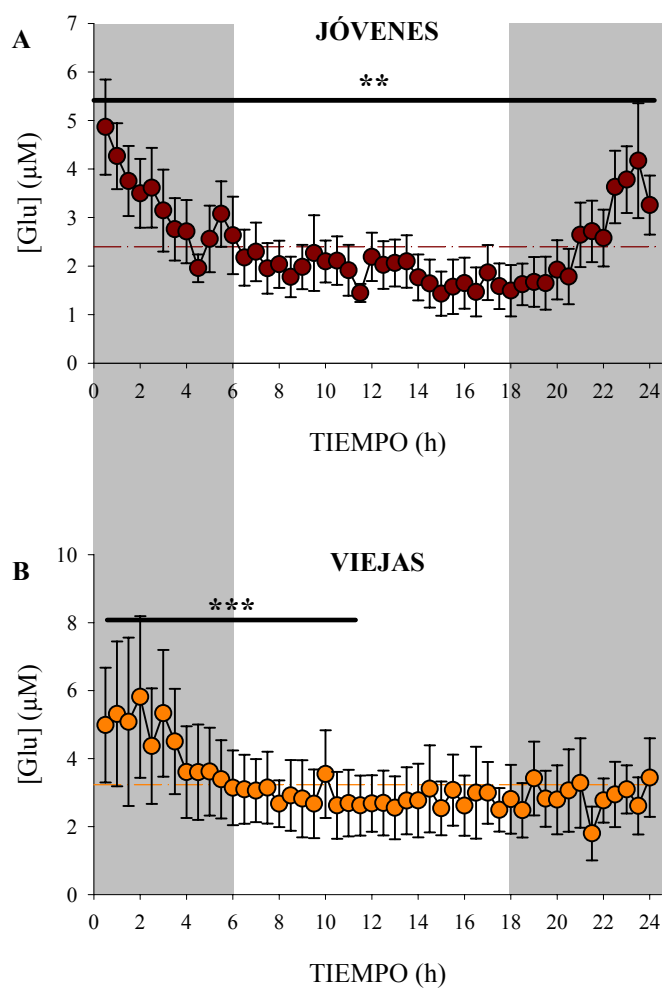


FIGURA 21: Concentraciones extracelulares de glutamato en el estriado de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

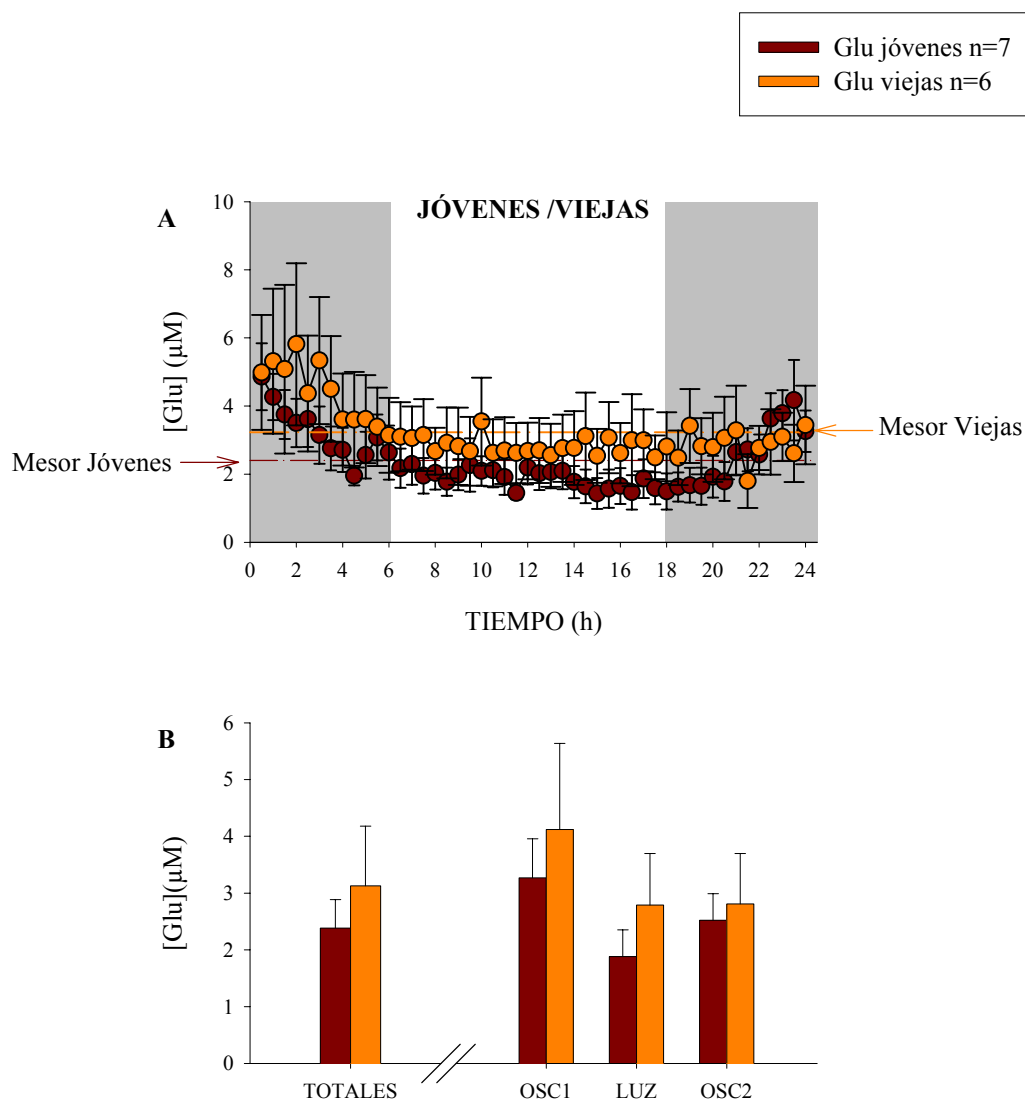


FIGURA 22: Comparación de las concentraciones extracelulares de glutamato en el estriado: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de glutamato: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,01.

PARÁMETROS DEL RITMO			
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
Glu Jóvenes	0,93±0,53 µM	2,41±0,5 µM	4,15 radianes
Glu Viejas	-----		

TABLA 8: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de glutamato en el estriado de ratas jóvenes y viejas.

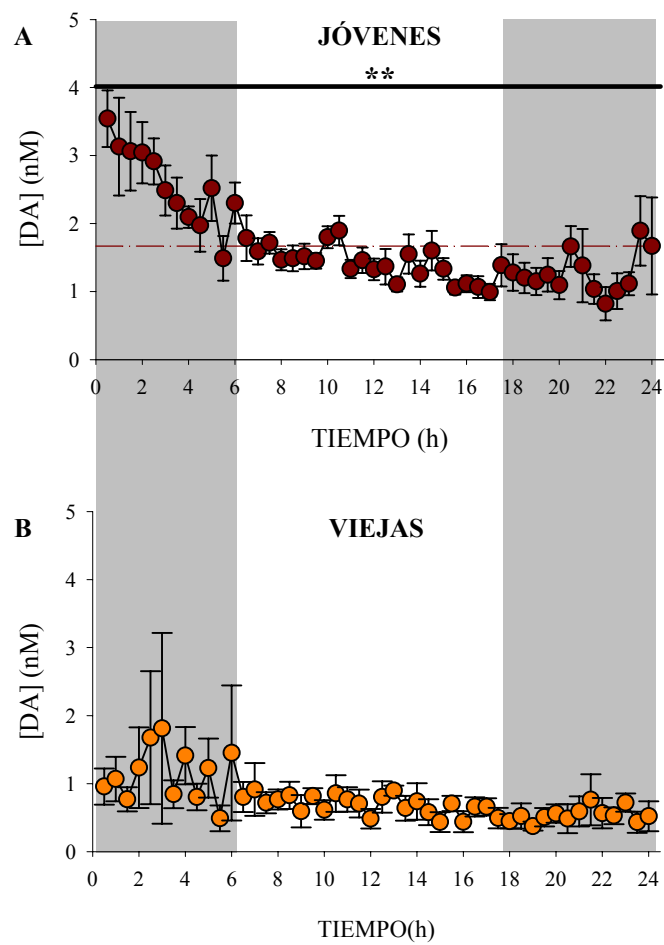


FIGURA 23: Concentraciones extracelulares de dopamina en el estriado de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

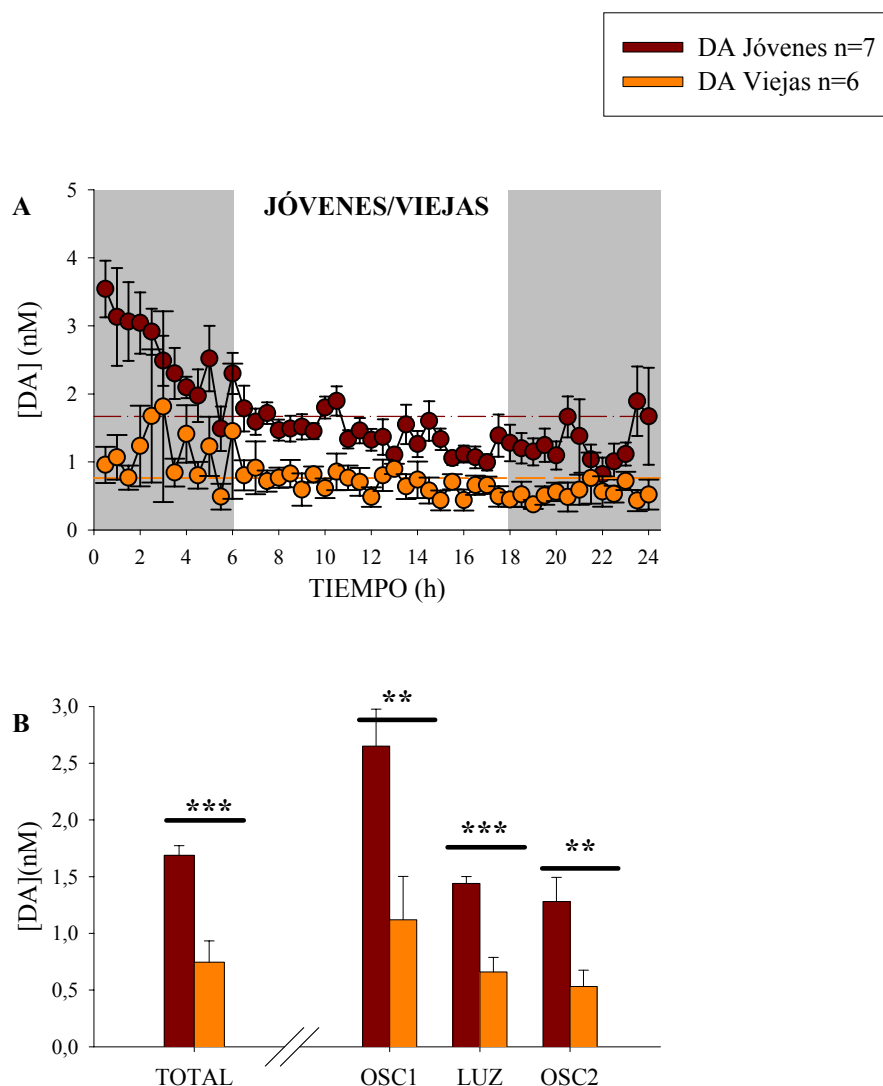


FIGURA 24: Comparación de las concentraciones extracelulares de dopamina en el estriado: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de dopamina: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

PARÁMETROS DEL RITMO			
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
DA Jóvenes	0,62±0,52 nM	1,70±0,07 nM	4,50 radianes
DA Viejas	-----		

TABLA 9: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de dopamina en el estriado de ratas jóvenes y viejas.

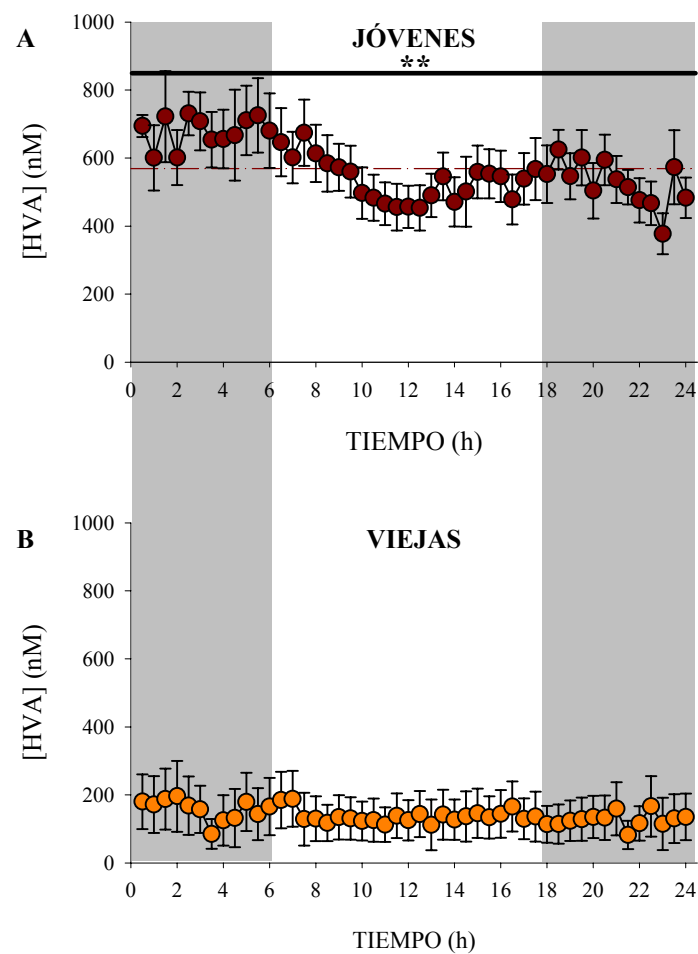


FIGURA 25: Concentraciones extracelulares de HVA en el estriado de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

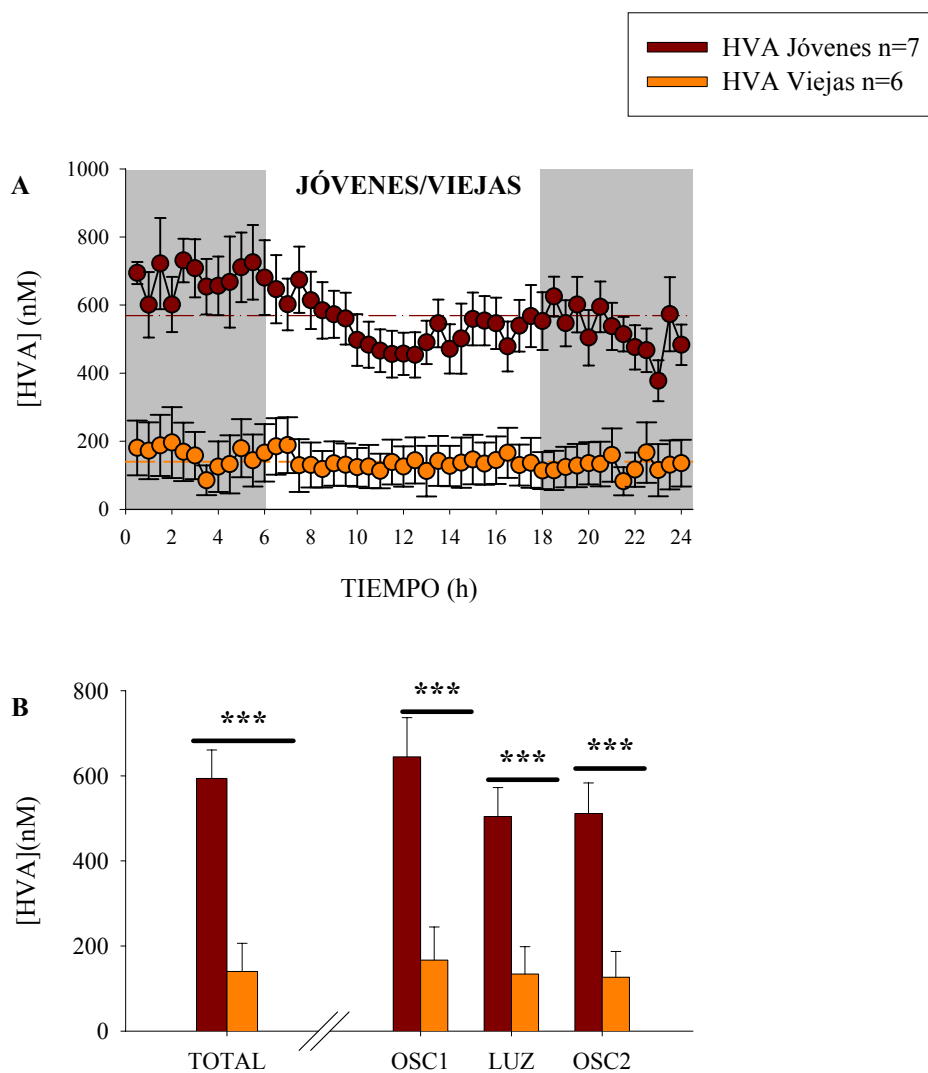


FIGURA 26: Comparación de las concentraciones extracelulares de HVA en el estriado: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de HVA: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,01.

PARÁMETROS DEL RITMO			
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
HVA Jóvenes	93,65±60,78 nM	559,1±67,68 nM	4,66 radianes
HVA Viejas	-----		

TABLA 10: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de HVA en el estriado de ratas jóvenes y viejas.

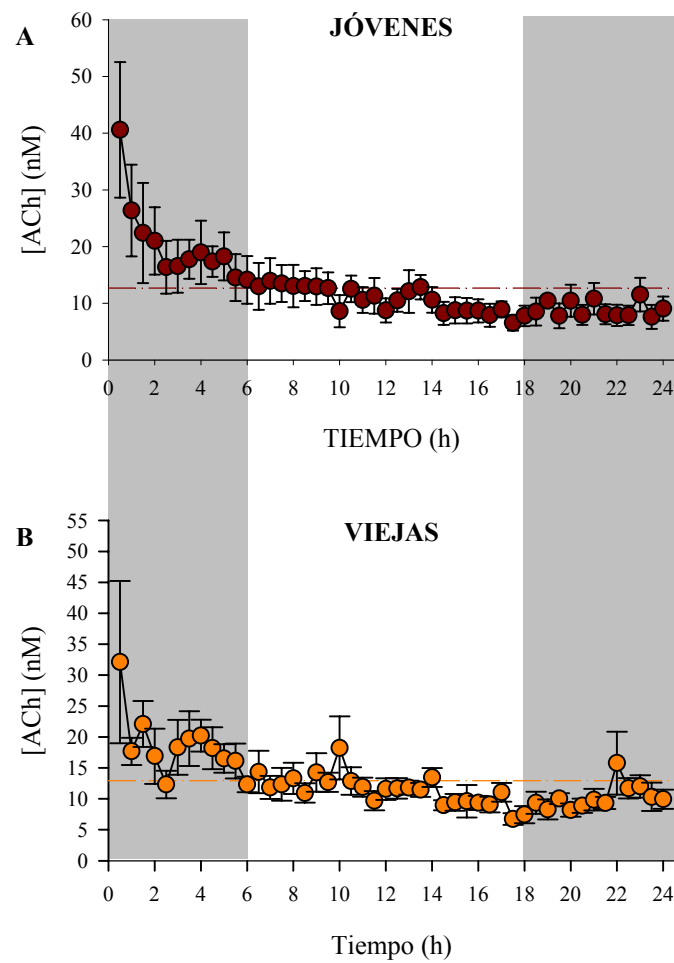


FIGURA 27: Concentraciones extracelulares de acetilcolina en el estriado de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

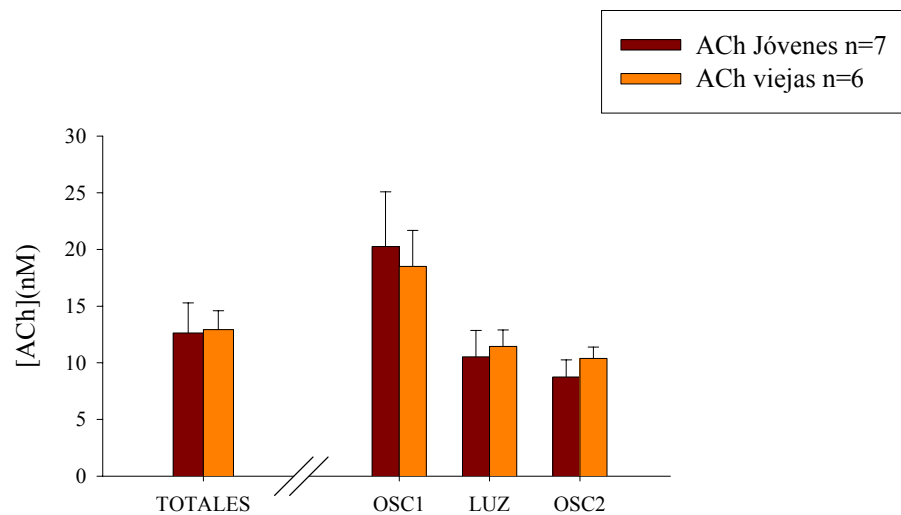


FIGURA 28: Comparación de las concentraciones extracelulares de acetilcolina en el estriado: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24).
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

5.3. Efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en el Núcleo Accumbens

Las concentraciones extracelulares basales en núcleo accumbens en el grupo de ratas jóvenes fueron: Glutamato = $2,18 \pm 0,92 \mu\text{M}$; dopamina = $1,75 \pm 0,59 \text{ nM}$; HVA = $155,16 \pm 42,22 \text{ nM}$; acetilcolina = $12,35 \pm 1,78 \text{ nM}$. En el grupo de ratas viejas las concentraciones extracelulares basales fueron: Glutamato = $1,70 \pm 0,52 \mu\text{M}$; dopamina = $2,42 \pm 0,52 \text{ nM}$; HVA = $183,28 \pm 46,13 \text{ nM}$; acetilcolina = $11,41 \pm 2,47 \text{ nM}$.

Las concentraciones extracelulares de **glutamato** en núcleo accumbens de ratas jóvenes no se ajustan a un modelo sinusoidal ($n=6$), aunque en 5 de los 6 animales estudiados se ajusta a un modelo sinusoidal. Por otro lado, las concentraciones extracelulares de glutamato disminuyen un 66,51% ($0,73 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales ($2,18 \pm 0,92 \mu\text{M}$) con el cambio al periodo de luz ($n=6$, $p<0,001$) y aumentan en el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 50% ($1,09 \mu\text{M}$) de las concentraciones basales ($n=6$, $p<0,05$) (Figura 29-A). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares de glutamato en núcleo accumbens muestran un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=7$, $p<0,05$) de amplitud 22,35% de las concentraciones basales ($1,70 \pm 0,52 \mu\text{M}$), mesor $0,96 \pm 0,23 \mu\text{M}$ y acrofase 16 horas 41 minutos 32 segundos (Figura 29-B, tabla 11).

El ritmo circadiano de glutamato en núcleo accumbens se mantiene en ratas viejas y, aunque no podemos comparar los parámetros del ritmo circadiano en viejas con el de jóvenes, parece no haber diferencias entre ambos (Figura 30-A, tabla 11).

Los niveles de glutamato en núcleo accumbens no son diferentes entre ratas jóvenes y viejas ni en total, ni separado por periodos del ciclo oscuridad/luz (Figura 30-B).

Las concentraciones extracelulares de **dopamina** en el núcleo accumbens no varían según un ritmo circadiano que se ajuste a un modelo sinusoidal ($n=6$), aunque en 5 de los 6 animales estudiados la dopamina muestra un ritmo circadiano que sí se ajusta a dicho modelo. Por otro lado las concentraciones extracelulares de dopamina disminuyen un 61,71% ($0,52 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($1,75 \pm 0,59 \text{ nM}$) con el paso al periodo de luz ($n=6$, $p<0,001$) y aumentan en el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 47,87% ($0,84 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($n=6$, $p<0,05$) (Figura 31-A). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares de dopamina en el núcleo accumbens mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=8$, $p<0,001$) de amplitud 17,77% de las concentraciones basales ($2,42 \pm 0,52 \text{ nM}$), mesor $1,78 \pm 0,38 \text{ nM}$ y acrofase 17 horas 34 minutos 15 segundos (Figura 31-B, tabla 12).

El ritmo circadiano de dopamina en núcleo accumbens no se pierde en ratas viejas y, aunque no podemos comparar los parámetros del ritmo de ratas viejas con los de ratas jóvenes, no parece haber diferencias (Figura 32-A, tabla 12).

Los niveles de dopamina no son diferentes entre ambos grupos, ni los totales, ni separados por periodos del ciclo oscuridad/luz (Figura 32-B).

Del mismo modo, las concentraciones extracelulares de su metabolito, **HVA**, en núcleo accumbens de ratas viejas no se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=6$), aunque en 5 de los 6 animales estudiados se ajustan a un modelo sinusoidal. Por otro lado, las concentraciones extracelulares de HVA disminuyen un 27,04% ($113,22 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($155,16 \pm 42,22 \text{ nM}$) con el paso al periodo de luz ($n=6$, $p<0,01$) y aumentan en el segundo periodo de oscuridad hasta alcanzar un 92,50% ($143,52 \text{ nM}$) de las concentraciones basales ($n=6$, $p<0,05$) (Figura 33-A). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares de HVA mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=8$, $p<0,01$) de amplitud 14,20% de las concentraciones basales ($183,28 \pm 46,13 \text{ nM}$), mesor $159,2 \pm 39,37 \text{ nM}$ y acrofase 15 horas 35 minutos 4 segundos (Figura 33-B, tabla 13).

El ritmo circadiano de HVA en núcleo accumbens no se pierde en ratas viejas y, aunque no podemos comparar los parámetros del ritmo circadiano en ratas viejas con los de ratas jóvenes, no parece haber diferencias (Figura 34-A, tabla 13).

Los niveles de HVA en el núcleo accumbens no muestran diferencias entre ambos grupos, ni totales, ni separadas por periodos del ciclo oscuridad/luz (Figura 34-B).

Las concentraciones extracelulares de **acetilcolina** en el núcleo accumbens de ratas jóvenes mostraron un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=6$, $p<0,01$) de amplitud 15,14% de las concentraciones basales ($12,35 \pm 1,78 \text{ nM}$), mesor $8,45 \pm 0,91 \text{ nM}$ y acrofase 17 horas 38 minutos 50 segundos (Figura 35-A, tabla 14). En ratas viejas, las concentraciones extracelulares de acetilcolina en núcleo accumbens no mostraron un ritmo circadiano que se ajuste a un modelo sinusoidal ($n=7$) y no disminuyeron ni aumentaron con los cambios de periodo del ciclo oscuridad/luz (Figura 35-B).

El ritmo circadiano de acetilcolina descrito en el núcleo accumbens se pierde en ratas viejas (Figura 36-A, tabla 14).

No se observan diferencias en los niveles de acetilcolina en núcleo accumbens entre los dos grupos, ni totales, ni separados por periodos del ciclo oscuridad/luz (Figura 36-B).

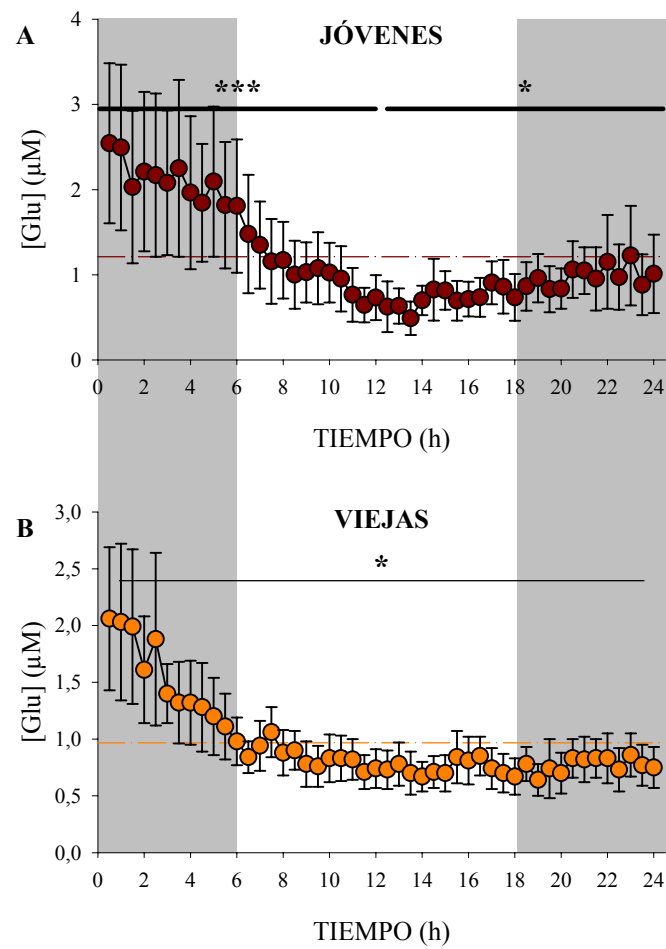


FIGURA 29: Concentraciones extracelulares de glutamato en el n. accumbens de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

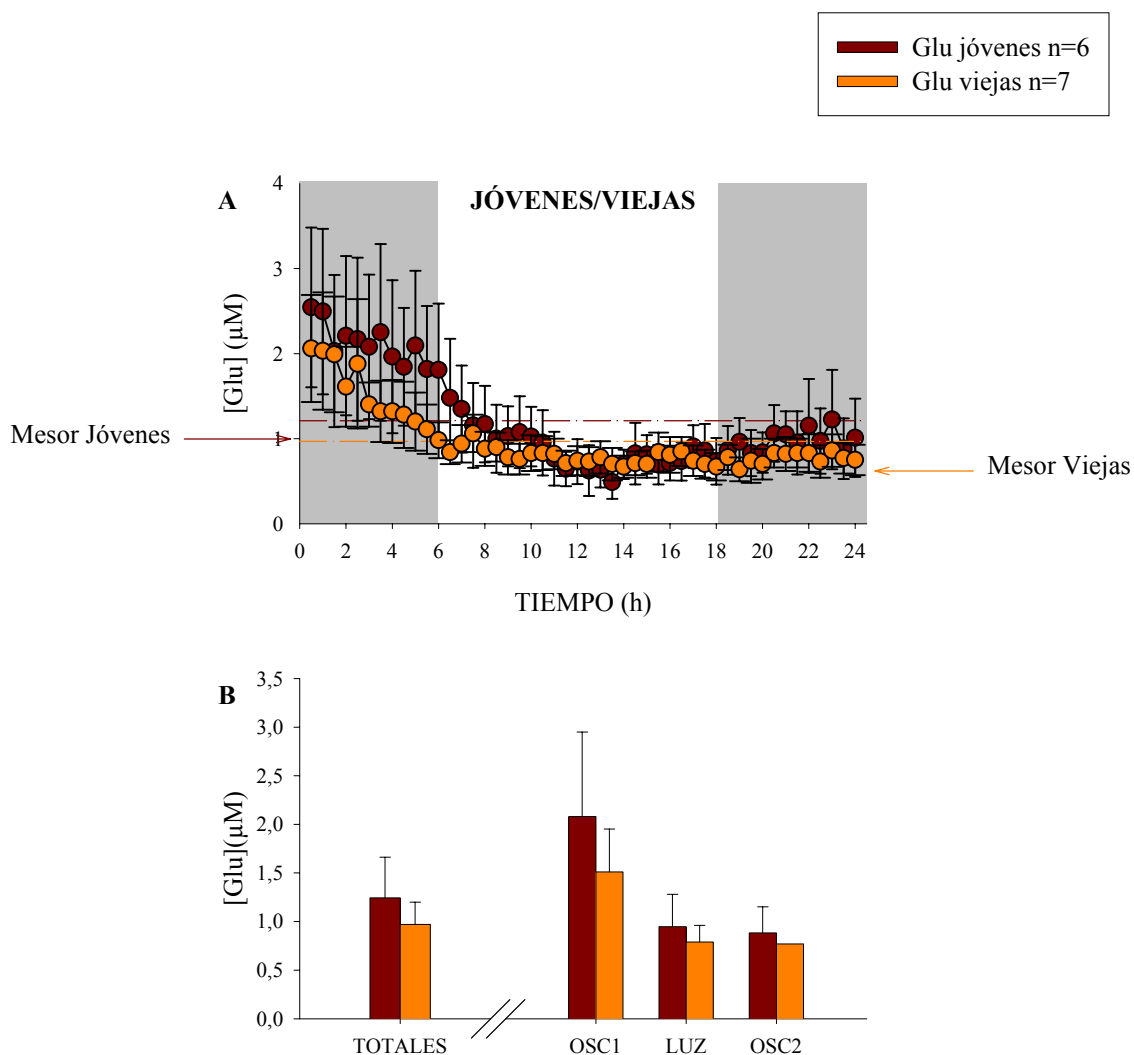


FIGURA 30: Comparación de las concentraciones extracelulares de glutamato en el n. accumbens: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de glutamato: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,01.

PARÁMETROS DEL RITMO			
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
Glu Jóvenes	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal. Regresiones significativas.		
Glu Viejas	0,38±2,24 µM	0,96±0,23 µM	4,37 radianes

TABLA 11: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de glutamato en el n. accumbens de ratas jóvenes y viejas.

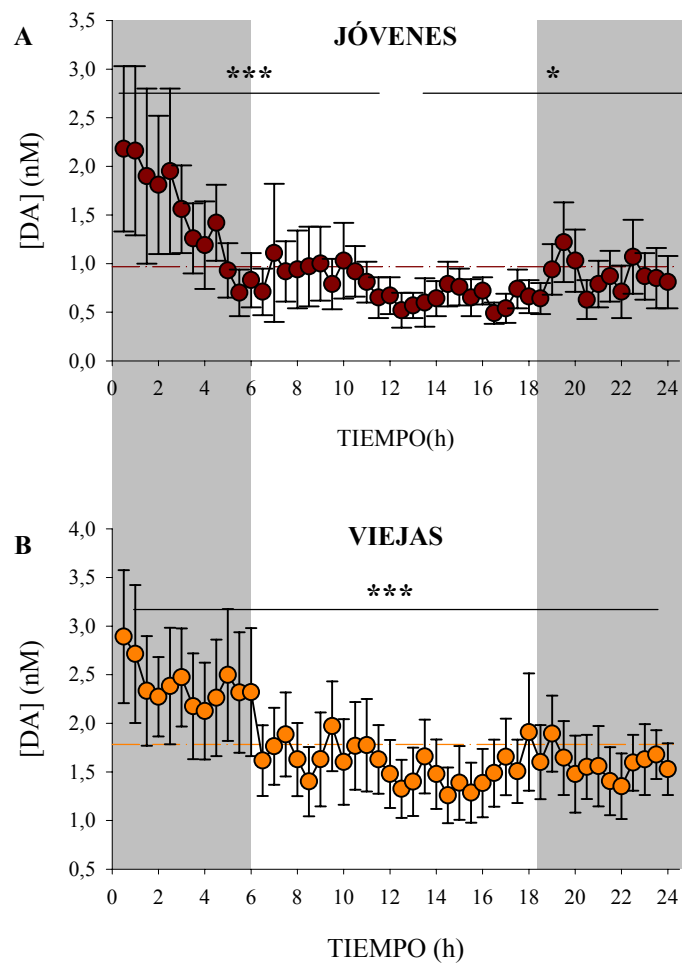


FIGURA 31: Concentraciones extracelulares de dopamina en el n. accumbens de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

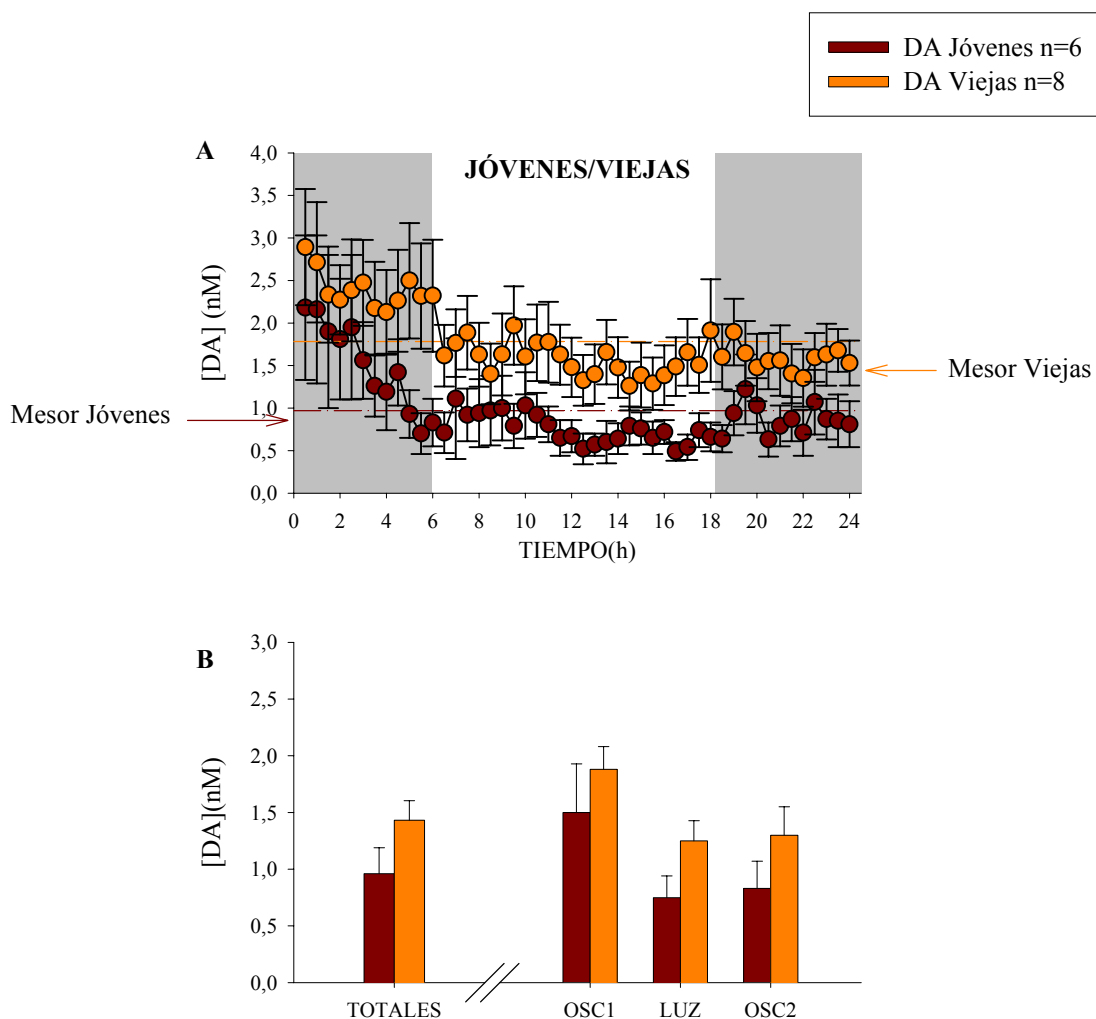


FIGURA 32: Comparación de las concentraciones extracelulares de dopamina en el n. accumbens: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de dopamina: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,01.

PARÁMETROS DEL RITMO			
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
DA Jóvenes	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal Regresiones significativas.		
DA Viejas	0,43±0,77 nM	1,78±0,38 nM	4,60 radianes

TABLA 12: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de dopamina en el n. accumbens de ratas jóvenes y viejas.

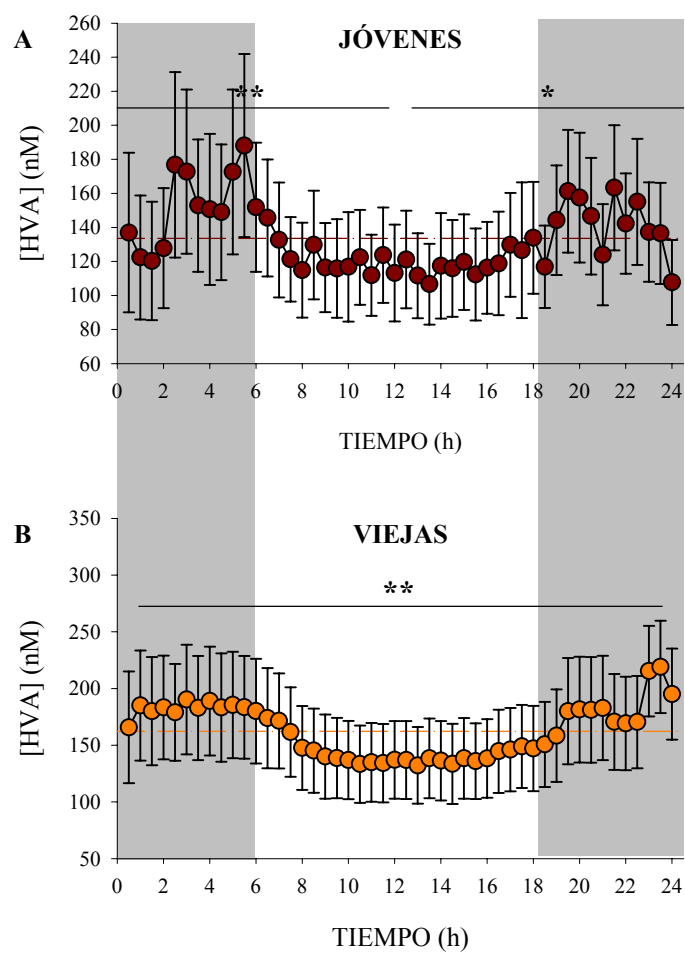


FIGURA 33: Concentraciones extracelulares de HVA en el n. accumbens de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

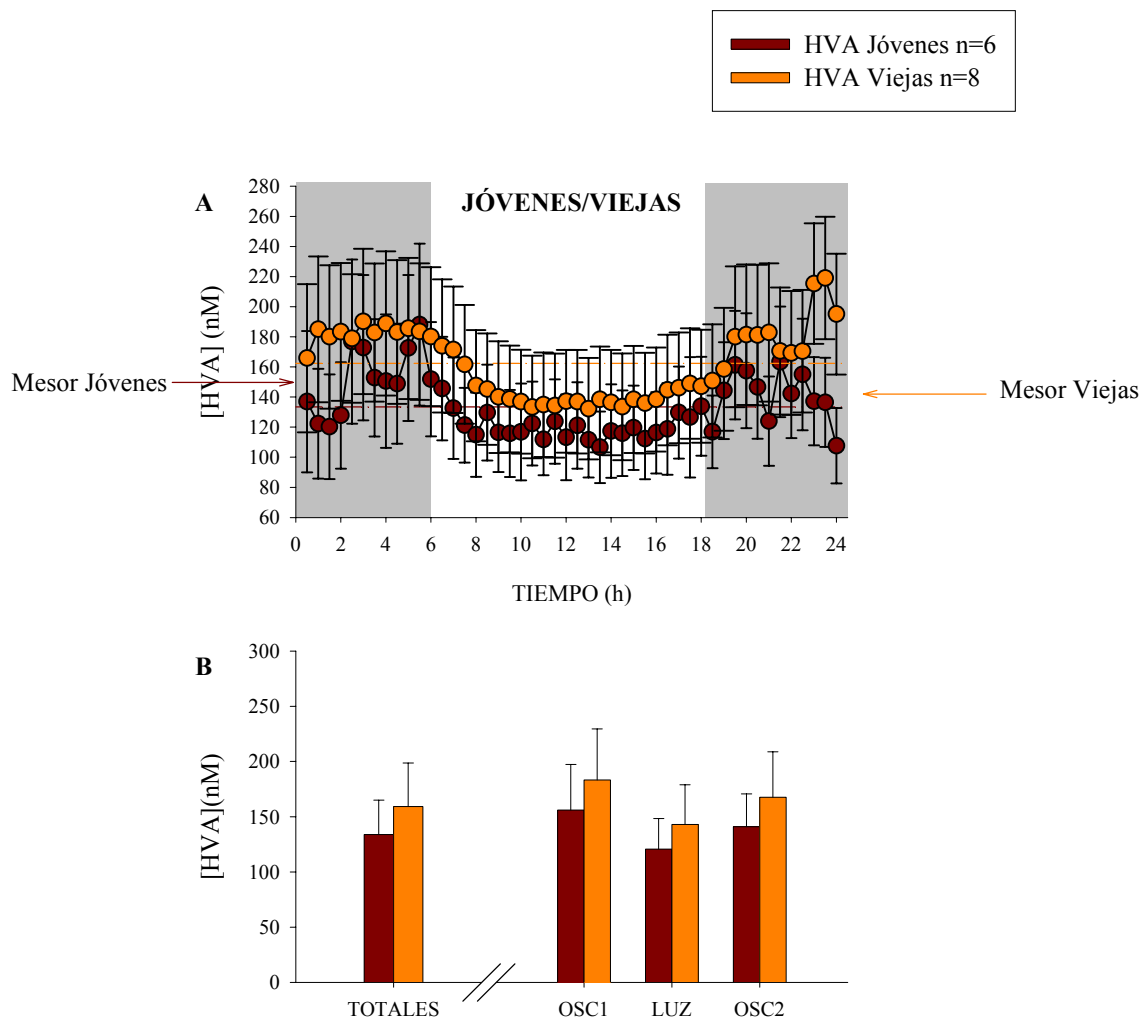


FIGURA 34: Comparación de las concentraciones extracelulares de HVA en el n. accumbens: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de HVA: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,01.

PARÁMETROS DEL RITMO			
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
HVA Jóvenes	No ajuste poblacional a un modelo sinusoidal Regresiones significativas.		
HVA Viejas	14,20% del basal	159,2±39,37 nM	15h 35' 4''

TABLA 13: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de HVA en el n. accumbens de ratas jóvenes y viejas.

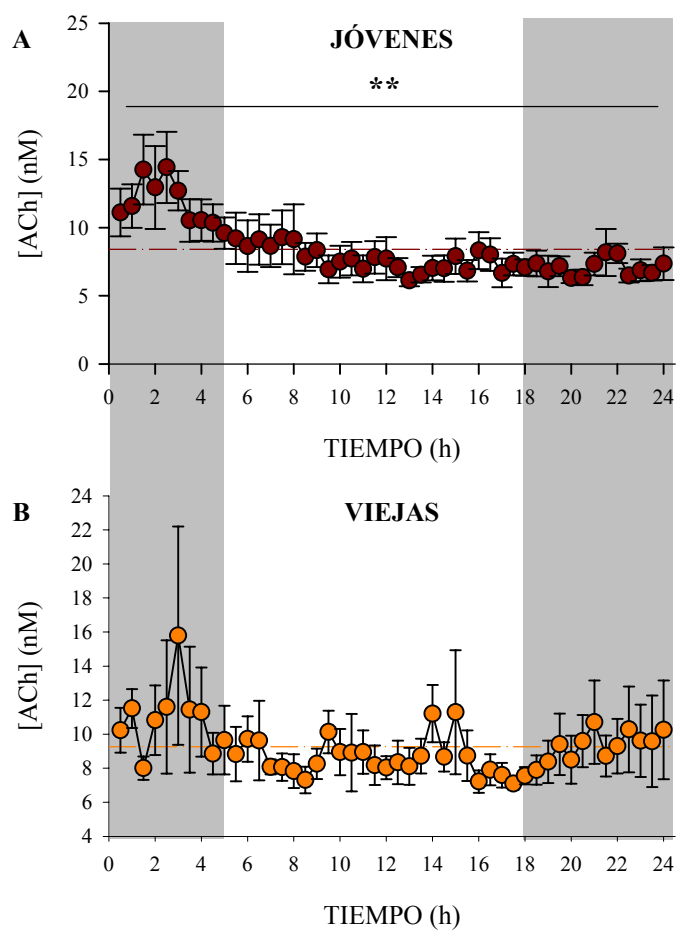


FIGURA 35: Concentraciones extracelulares de acetilcolina en el n. accumbens de la rata despierta bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz en **A)** ratas jóvenes (2-4 meses) y **B)** ratas viejas (23-25 meses). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

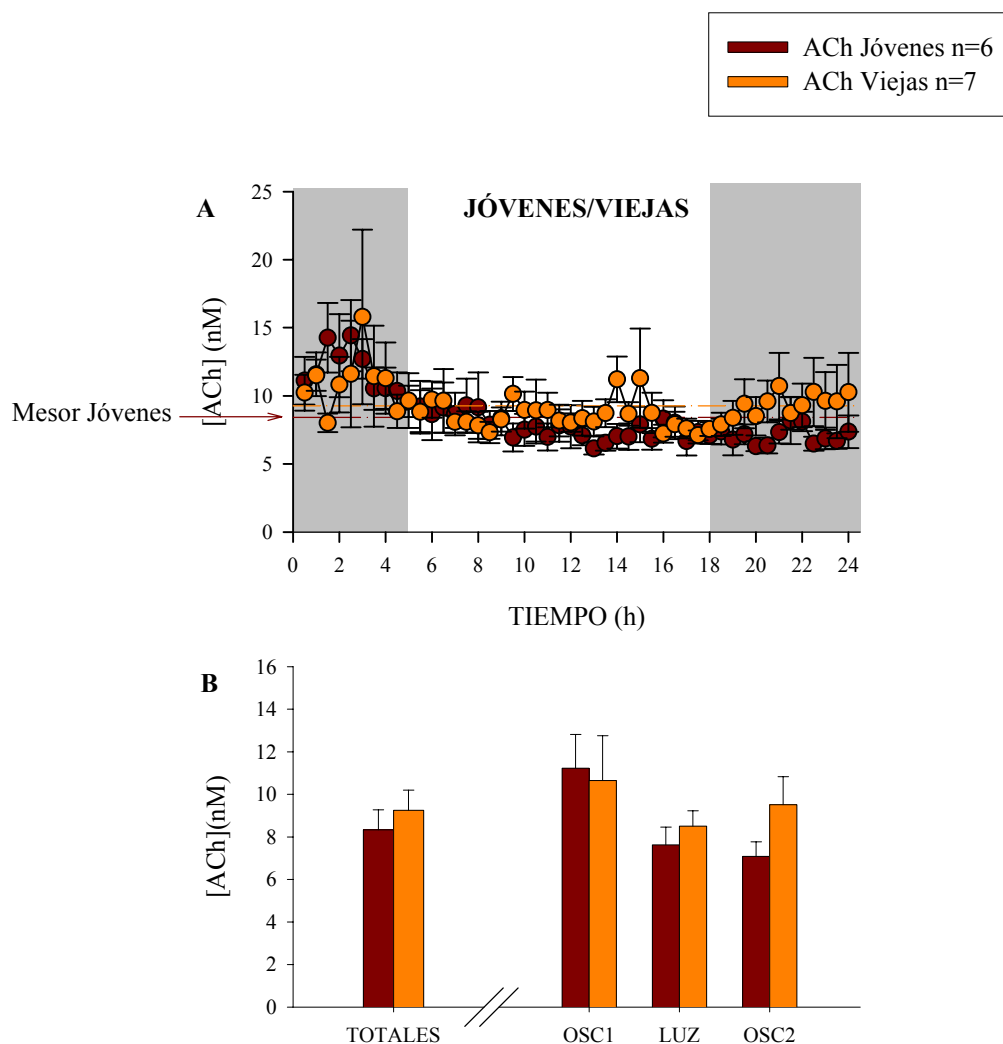


FIGURA 36: Comparación de las concentraciones extracelulares de acetilcolina en el n. accumbens: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de las concentraciones extracelulares de acetilcolina: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,01.

	PARÁMETROS DEL RITMO		
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
ACh Jóvenes	1,87±2,60 nM	8,45±0,91 nM	4,62 radianes
ACh Viejas	-----		

TABLA 14: Parámetros de los ritmos circadianos de las concentraciones extracelulares de acetilcolina en el n. accumbens de ratas jóvenes y viejas.

5.4. Efecto del envejecimiento sobre el ritmo circadiano de actividad motora.

Los niveles basales de actividad motora de las ratas jóvenes fueron $687,56 \pm 118,90$ n° de cortes de haz y los niveles basales de actividad motora de las ratas viejas fueron $600,60 \pm 30,61$ n° de cortes de haz.

La **actividad motora** de los animales jóvenes estudiados mostró un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=19$, $p<0,001$) de amplitud 62,74% del nivel basal ($687,56 \pm 118,90$ n° de cortes de haz), mesor $603,8 \pm 44,14$ n° de cortes de haz y acrofase 14 horas 26 minutos 19 segundos (Figura 37-A, tabla 15). La actividad motora de los animales viejos estudiados mostró un ritmo circadiano, con un máximo en el periodo de oscuridad, que se ajusta a un modelo sinusoidal ($n=22$, $p<0,001$) de amplitud 39,92% del nivel basal ($600,60 \pm 30,61$ n° de cortes de haz), mesor $413,7 \pm 21,53$ n° de cortes de haz y acrofase 14 horas 24 minutos 1 segundo (Figura 37-B, tabla 15).

El ritmo circadiano de la actividad motora se mantiene en ratas viejas. Al comparar ambos ritmos, el test del mesor muestra diferencias ($p<0,001$) así como el test conjunto de la amplitud-acrofase ($p<0,01$) (Figura 38-A).

Los niveles totales de actividad motora son menores en ratas viejas ($p<0,01$), aunque al separar los niveles por periodos se observó que son menores en los periodos de oscuridad ($p<0,01$) no habiendo diferencia en el periodo de luz (Figura 38-B).

Al solapar las gráficas no parece haber diferencias en las acrofases mientras que al comparar los niveles por periodos se observó que son menores en ratas viejas en los periodos de oscuridad ($p<0,01$), no habiendo diferencias en el periodo de luz (Figura 38-B). Esto parece sugerir que la diferencia observada en el test conjunto para la amplitud y la acrofase es debida a una menor amplitud en el ritmo circadiano de viejas. Podemos decir que el ritmo circadiano de la actividad motora en ratas viejas muestra un mesor y una amplitud menores que el ritmo circadiano de actividad motora de las ratas jóvenes. No habiendo diferencia en la acrofase.

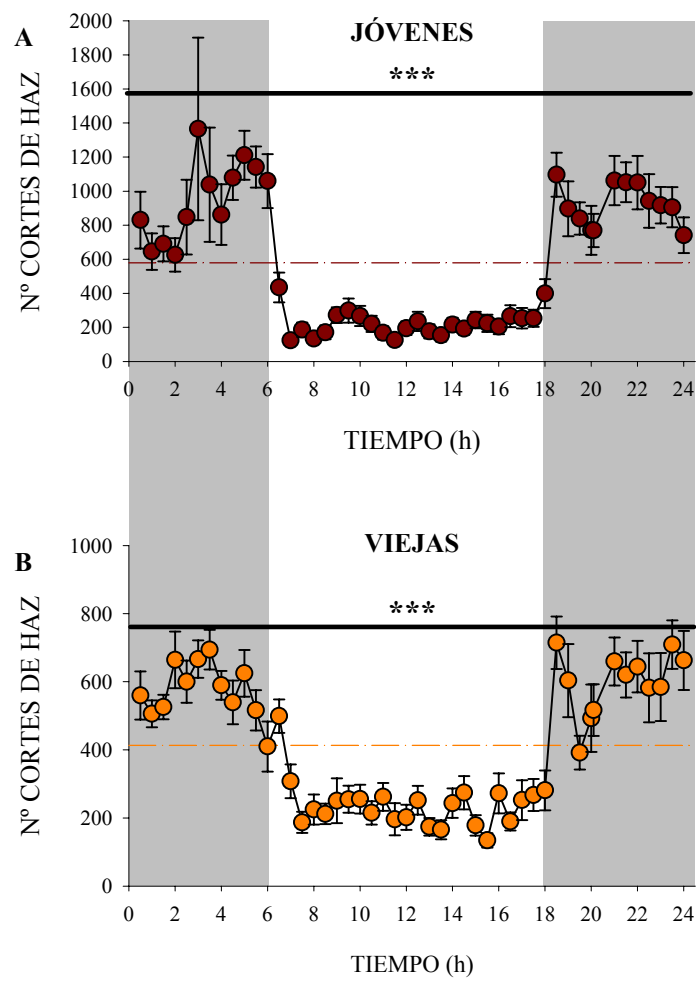


FIGURA 37: Actividad motora de los animales estudiados, **A)** jóvenes (2-4 meses) y **B)** viejos (23-25 meses), bajo un ciclo 12h oscuridad/12h luz. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

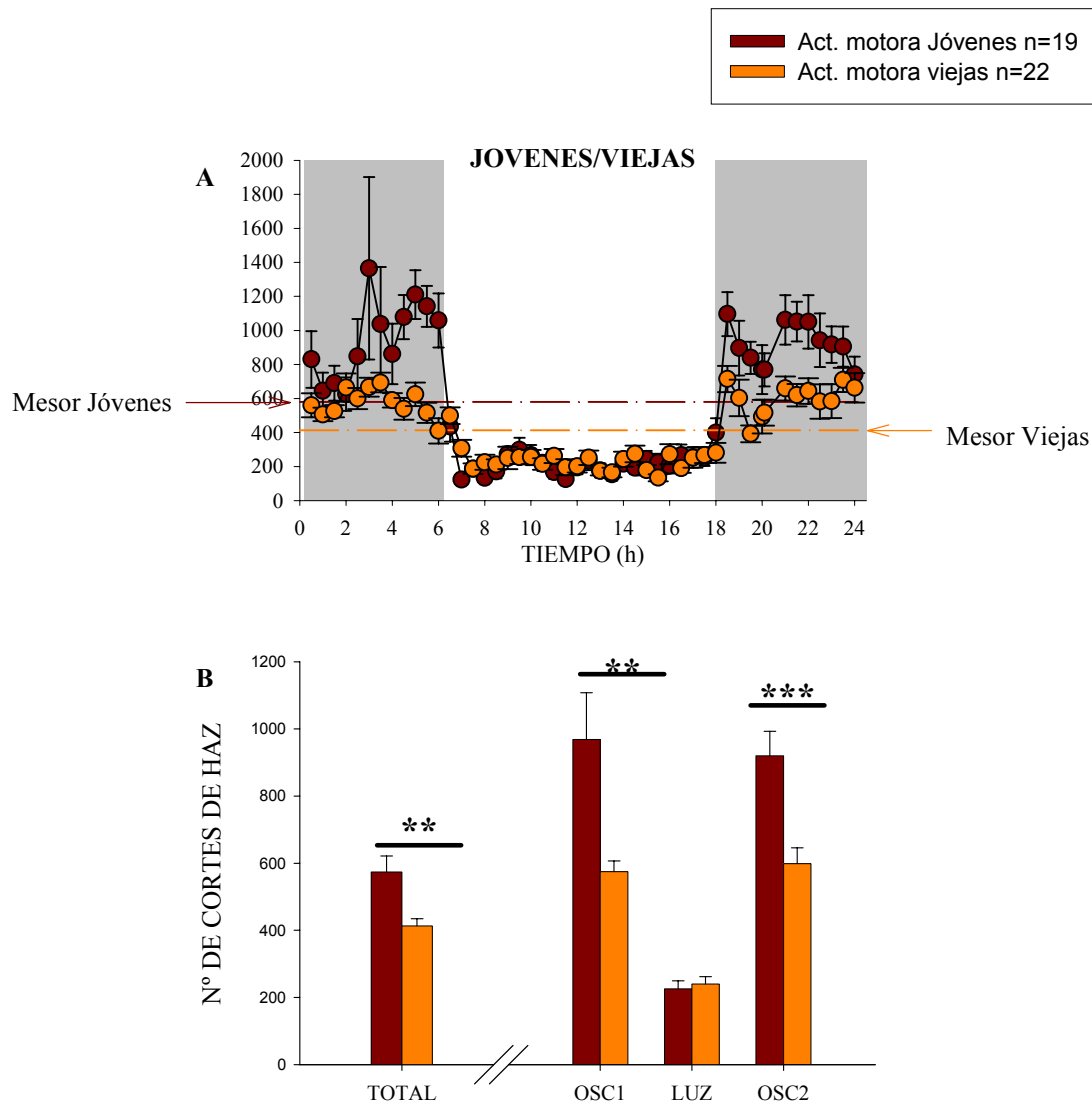


FIGURA 38: Comparación de la actividad motora de ratas jóvenes y viejas: **A)** comparación de los perfiles temporales y **B)** comparación de las medias de actividad motora: TOTALES, durante todo el experimento; OSC1, durante primer periodo de oscuridad (horas 1-6); LUZ, durante el periodo de luz (horas 6-18) y OSC2, durante el segundo periodo de oscuridad (horas 18-24). * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,01.

PARÁMETROS DEL RITMO			
	AMPLITUD	MESOR	ACROFASE
Act. motora Jóvenes	62,74% del basal	603,8±44,14	14h 26' 19''
Act. motora Viejas	39,92% del basal	413,7±21,53	14h 24' 1''

TABLA 15: Parámetros de los ritmos circadianos de la actividad motora de ratas jóvenes y viejas.

IV. Discusión

5.1. Efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en la Corteza Prefrontal

El ritmo circadiano de glutamato se pierde en la corteza prefrontal de ratas viejas, la dopamina no muestra ritmo circadiano ni en ratas jóvenes ni viejas, el ritmo circadiano de HVA no se modifica en ratas viejas y el de acetilcolina se mantiene pero es menor en amplitud.

Las causas de estos cambios en los ritmos circadianos de neurotransmisores en la corteza prefrontal de ratas viejas no se conocen. Sin embargo, existe la posibilidad de que estos cambios sean debidos a los cambios que se producen en el núcleo supraquiasmático con la edad, ya que este núcleo inerva la corteza prefrontal (Sylvester et al., 2002) y es el reloj principal que regula los ritmos circadianos del organismo (Moore y Leak, 2001). Se ha descrito que el ritmo circadiano de la actividad las neuronas del núcleo supraquiasmático disminuye en amplitud y muestra un acortamiento de su periodo en curso libre (Pandi-Perumal et al., 2001).

En el caso del glutamato, el ritmo circadiano se pierde en ratas viejas, así que no parece que dependa de los cambios producidos en el núcleo supraquiasmático con la edad ya que esta estructura no pierde su ritmo circadiano. Las concentraciones extracelulares de glutamato disminuyen en el cambio de periodo de oscuridad al de luz pero no aumenta en el segundo cambio a oscuridad, esto hace que no observemos un ritmo circadiano de glutamato en ratas viejas. Un alargamiento en el periodo del ritmo circadiano no nos permitiría observar el ritmo circadiano ya que sólo medimos un ciclo de 24 horas. Sin embargo, los cambios en el periodo de los ritmos circadianos debidos al envejecimiento descritos hasta ahora sólo ocurren en condiciones de curso libre, lo cual no es el caso de los animales estudiados, y suelen consistir en un acortamiento del periodo. Por otro lado las concentraciones de glutamato dependen en gran medida de su recaptura por los astrocitos y se han descrito cambios con la edad en los astrocitos de corteza prefrontal, existiendo un aumento en su número, tamaño y actividad (Vazquez et al., 1992; Amenta et al., 1998), así como cambios en la recaptura de glutamato (Segovia et al., 2001). Sin embargo los niveles de glutamato en ratas viejas no son distintos al de ratas jóvenes. También se ha descrito una disminución en la recaptura por parte de las neuronas (Segovia et al., 2001), lo que compensaría el incremento de recaptura por los astrocitos. Esta compensación no permite observar diferencias en los niveles de jóvenes y viejas pero la regulación del ritmo circadiano podría estar alterada.

Por otro lado, los niveles de melatonina circulantes están muy disminuidos en animales viejos (Savaskan, 2002) y como hemos visto en el bloque 4 el ritmo circadiano de glutamato estaría regulado en parte por la melatonina, a través de su efecto inhibitorio de la actividad de los astrocitos. Al estar el número y actividad de los astrocitos elevados y la melatonina disminuida en ratas viejas la regulación del ritmo circadiano de glutamato estaría alterada.

El sistema dopaminérgico mantiene su ritmo circadiano en ratas viejas sin modificaciones, así que tampoco parece estar influenciado por las alteraciones del núcleo supraquiasmático con la edad. La dopamina no varía según un ritmo circadiano ni en ratas jóvenes ni en ratas viejas y las concentraciones extracelulares de HVA muestran un ritmo circadiano en ambos grupos de edad, no habiendo diferencias entre ambos ritmos. La actividad circadiana del sistema dopaminérgico de corteza prefrontal no cambia con la edad. Además ni los niveles de

dopamina ni los de HVA son distintos entre ratas jóvenes y viejas. La pérdida neuronal dopaminérgica se produce principalmente en sustancia nigra, que inerva estriado, pero no en área tegmental ventral que es el área mesencefálica que inerva a la corteza prefrontal (Palmer y Dekasky, 1993). Esto explica que los niveles de dopamina y HVA no se modifiquen, ya que son reflejo de la actividad dopaminérgica (Del Arco et al., 2003). Esto no significa que el sistema dopaminérgico de corteza prefrontal no sufra cambios con la edad. Estos consisten principalmente en una disminución en el número de receptores y de la respuesta asociada a receptor (Joyce et al., 1986, Morelli et al., 1990; Murray y Waddington 1991; Barili et al., 1998).

El ritmo circadiano de acetilcolina en corteza prefrontal, al igual que ocurre con la actividad de las neuronas del núcleo supraquiasmático, tiene menor amplitud en ratas viejas. Es posible que estos cambios sean debidos a los cambios de la regulación del núcleo supraquiasmático sobre el sistema colinérgico de corteza prefrontal. Los niveles de acetilcolina son menores en ratas viejas en los periodos de oscuridad, lo que apoya una disminución de la amplitud del ritmo circadiano. Tanto la disminución de sus niveles como la de su amplitud han sido descritas previamente por Mitsushima et al. (1996). Sin embargo en este estudio no encuentran ritmo circadiano de acetilcolina en ratas viejas y lo atribuyen a que su baja amplitud no les permite detectarlo. La disminución de los niveles de acetilcolina puede ser debida principalmente a la pérdida de neuronas colinérgicas del telencéfalo basal con el envejecimiento (Stoessl A.J. et al. 1989; Gallagher and Colombo, 1995; Muir, 1997), ya que esta es una de las principales fuentes de la inervación colinérgica en la corteza prefrontal (Fibiger H.G., 1982; Fuster, 1997). También se han descrito disminuciones con la edad tanto en la liberación inducida por K^+ de acetilcolina (Hezog et al., 2003) como en la actividad de las neuronas colinérgicas que proyectan a corteza (Aston-Jones et al., 1985; Buzsaki et al., 1988). Pero además las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal inervan al núcleo supraquiasmático (Bina et al., 1993; Ferguson et al., 1999) y se ha descrito que su lesión en ratas jóvenes produce una disminución en la amplitud de ritmos controlados directamente por este núcleo como son el de actividad locomotora y el de temperatura, similar a la que se produce en ratas viejas (Endo et al., 2001).

Como hemos visto en el bloque 4, la melatonina regula los ritmos circadianos de dopamina y acetilcolina en la corteza prefrontal. Y la melatonina circulante es menor en ratas viejas (Savaskan, 2002). No cabe descartar que la regulación que la melatonina ejerce sobre estos ritmos circadianos esté alterada.

Aunque no todos los neurotransmisores cambien con la edad, la función de la estructura cambia. La alteración del ajuste fino en la interacción de neurotransmisores puede ser la base de las disminuciones funcionales encontradas en el envejecimiento cerebral (Mora, 1999). Las aferencias colinérgicas provenientes de telencéfalo basal forman conexiones no sinápticas o varicosidades, y hay receptores y transportadores extrasinápticos, lo que implica transmisión volumétrica (Somogy et al., 1998) y una función regulando otros sistemas de neurotransmisores. La acetilcolina facilita la liberación de dopamina (Drew et al., 2000; Galindo, 2002) a través de receptores muscarínicos y nicotínicos (Galindo, 2002). Así que cuando la acetilcolina cambia con la edad, es principalmente la regulación del sistema lo que está cambiando. Además el número de receptores de dopamina disminuye, alterándose la función dopaminérgica así como la interacción entre el sistema dopaminérgico y el glutamatérgico (Segovia et al. 2001).

5.2. Efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en el Estriado.

Glutamato, dopamina y HVA pero no acetilcolina tienen un ritmo circadiano de sus concentraciones extracelulares en ratas jóvenes. En ratas viejas ninguno de los neurotransmisores estudiados muestra un ritmo circadiano.

No se han descrito proyecciones directas del núcleo supraquiasmático a esta estructura, luego los cambios observados debidos al envejecimiento no parecen efecto directo de los cambios en la inervación del núcleo supraquiasmático al estriado. Por otro lado la melatonina tiene un papel importante en la regulación de la actividad del estriado (Zisapel, 2001) y los niveles de melatonina están disminuidos en animales viejos (Savanska, 2004), así que la regulación circadiana del estriado puede estar deteriorada.

El ritmo circadiano de glutamato en estriado ha sido previamente descrito en nuestro laboratorio (Márquez de Prado et al., 2000; Castañeda et al., 2004) y se ha sugerido que depende principalmente de la actividad de los astrocitos (Márquez de Prado et al., 2000; Castañeda, 2004). Además este ritmo está regulado en parte por la melatonina, ya que la melatonina perfundida por microdiálisis en el estriado altera el ritmo circadiano de glutamato (Márquez de Prado et al., 2000) y la perfusión iontoforética de melatonina inhibe la función excitatoria dependiente de glutamato producida por la estimulación de la corteza motora posiblemente a través de la inhibición de sus receptores NMDA (Escames et al., 2001).

El ritmo circadiano de glutamato cambia como consecuencia del proceso de envejecimiento. En ratas de edad media se ha descrito una disminución del mesor de dicho ritmo (Esquifino et al., 2002) y observamos que en ratas viejas se pierde el ritmo circadiano. Esta pérdida del ritmo circadiano probablemente es debida a alteraciones en su regulación, ya que en animales viejos aumenta la actividad de los astrocitos (Pasinetti et al., 1999) y con ello está aumentada la recaptura de glutamato por parte de estas células (Segovia et al., 2001), y que los niveles de melatonina disminuyen con la edad (Savanska, 2004). Sin embargo no se observan cambios en los niveles de glutamato entre jóvenes y viejas, a pesar de que estos dependen en gran parte de su recaptura (Del Arco, et al., 2003). Al igual que en la corteza prefrontal, el incremento de la recaptura de los astrocitos está compensada por una disminución de la recaptura neuronal (Segovia et al., 2001). Aunque no se han observado cambios en la liberación basal, ni en la estimulada por K^+ , de glutamato en estriado (Segovia et al., 2001) la existencia de una disminución de los receptores NMDA en estriado (Mishizen et al 2001; Segovia et al. 2001, Villares y Stavale, 2001) apoya que el sistema glutamatérgico está deteriorado en ratas viejas.

El ritmo circadiano de dopamina y HVA en estriado ha sido descrito previamente en otros trabajos de nuestro laboratorio (Márquez de Prado et al., 2000) y por otros trabajos (Paulson and Robinson, 1994; Smith et al, 1996; Paulson and Robinson, 1996), en todos los casos la dopamina muestra un ritmo circadiano con sus niveles máximos en el periodo de oscuridad, que coincide con el periodo de actividad del animal. La actividad de las neuronas nigroestriatales muestra un ritmo circadiano con un máximo en la oscuridad (Zisapel, 2001) y las concentraciones extracelulares de dopamina son reflejo de la actividad de estas terminales (Del Arco, 2003). Aunque la perfusión local de melatonina no parece alterar el ritmo circadiano ni de sus metabolitos, es posible que la melatonina module la actividad de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (Márquez de Prado et al., 2000) y regule así la función dopaminérgica de estriado. De hecho otros autores muestran una función inhibitoria

de la melatonina sobre la dopamina estriatal, tanto a nivel de actividad de las fibras como a nivel de receptor (Khaldy et al., 2001; Zisapel, 2001).

El proceso de envejecimiento afecta a los ritmos circadiano de dopamina, ya que se ha descrito una disminución del mesor de este ritmo en ratas de edad media (Esquifino et al., 2002) y en las ratas viejas, el ritmo circadiano de dopamina se pierde. Aunque es posible que, al igual que en el caso del glutamato, la disminución de los niveles de melatonina que ocurre con el envejecimiento esté implicada en las alteraciones de este ritmo circadiano, el hecho de que se produzca una disminución tan marcada de los niveles de dopamina y HVA sugiere que la propia alteración del sistema dopaminérgico en esta estructura no permite su regulación circadiana. Los efectos del envejecimiento sobre el sistema dopaminérgico estriatal incluyen una disminución del número de receptores y transportadores dopaminérgicos así como una disminución en la síntesis, liberación y recaptura de la dopamina (Stoessl et al., 1989; Joyce, 2001; Stanford et al., 2001) y una pérdida neuronal en la sustancia nigra que implica una disminución de los niveles de dopamina en estriado (Stoessl et al., 1989; Rehman et al. 2001). Todo esto explica por qué las concentraciones extracelulares de dopamina y HVA son más bajas en ratas viejas. Tanto la disminución de los niveles totales de catecolaminas con la edad como la pérdida del ritmo circadiano en dopamina ya han sido descrita previamente y se ha sugerido que la reducción en la variación de las monoaminas en estriado es uno de los factores que subyace a los cambios relacionados con la edad de los ritmos reposo/actividad y/o sueño/vigilia (Sano et al., 1992).

Las concentraciones extracelulares de acetilcolina no muestran un ritmo circadiano ni en ratas jóvenes ni en ratas viejas. Tampoco observamos cambios significativos en los niveles de este neurotransmisor con el envejecimiento. Esto no significa que el sistema colinérgico de estriado no esté afectado por el proceso de envejecimiento, ya que, aunque se ha descrito que no hay cambios en la liberación basal de acetilcolina con la edad, la liberación estimulada por K^+ de este neurotransmisor es menor en ratas viejas (Weiler et al., 1999). Además su interacción con otros sistemas neurotransmisores está modificada. Se ha descrito que existe una interacción entre los sistemas dopaminérgico y colinérgico en estriado. La dopamina inhibe la liberación de acetilcolina en el estriado a través de receptores D_2 (Galindo, 2002). Durante el proceso de envejecimiento los niveles de dopamina disminuyen y hay una pérdida de receptores D_2 en estriado (Stoessl et al., 1989), lo que hace que la interacción entre los dos sistemas de neurotransmisores se vea alterada.

5.3. Efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadiano de glutamato, dopamina y acetilcolina en el Núcleo Accumbens

Las concentraciones extracelulares de glutamato, dopamina, HVA y acetilcolina muestran un ritmo circadiano en el núcleo accumbens de ratas jóvenes. En ratas viejas glutamato, dopamina y HVA mantienen el ritmo circadiano sin diferencias significativas, mientras que la acetilcolina pierde el ritmo circadiano de sus concentraciones extracelulares.

El núcleo supraquiasmático, reloj circadiano del organismo, inerva al núcleo accumbens a través del núcleo paraventricular del tálamo (Patrickson, 2002) y el ritmo circadiano de la actividad de sus neuronas con la edad disminuye en amplitud y muestra un acortamiento de su periodo en curso libre (Pandi-Perumal et al., 2001). Así es posible que la regulación de la actividad circadiana del núcleo accumbens esté modificada en animales viejos.

Las concentraciones extracelulares de glutamato muestran un ritmo circadiano con un máximo en el periodo de oscuridad. Este ritmo circadiano en núcleo accumbens ya ha sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Castañeda et al., 2004). En ratas viejas este ritmo circadiano se mantiene, y sus niveles tampoco son diferentes entre ratas jóvenes y ratas viejas. De hecho, no se han encontrado diferencias en la liberación basal de glutamato en el núcleo accumbens con el envejecimiento (Segovia et al., 2001) y, aunque se ha descrito que el número de astrocitos aumenta con la edad (Yoshimoto et al., 2001) su actividad debe estar compensada ya que las concentraciones extracelulares no se ven afectadas. Aunque los niveles basales del neurotransmisor no estén modificados existe una disminución de receptores NMDA en núcleo accumbens (Villares y Stavale, 2001) que hace que la actividad del sistema glutamatérgico esté afectada.

La dopamina en el núcleo accumbens muestra un ritmo circadiano con un máximo en la oscuridad, el HVA muestra un ritmo circadiano con un máximo en el mismo periodo. Este ritmo circadiano ha sido previamente descrito en nuestro laboratorio (Castañeda et al., 2004). Paulson y Robinson (1994) muestran un ritmo circadiano de HVA pero no de dopamina en accumbens y sugieren una diferencia dorsoventral con respecto a estriado, diferencias en cantidad de transportadores, en innervación y en concentraciones, que haría que la dopamina no estuviera regulada de manera circadiana. Sin embargo otros trabajos sugieren que el HVA sería índice de los niveles de dopamina en esta área del cerebro (O'Neill y Fillenz, 1985; Westerink, 1995). Además, Paulson y Robinson en un trabajo posterior (1996) describen un ritmo circadiano en las concentraciones extracelulares de dopamina en el núcleo accumbens.

Las concentraciones extracelulares de dopamina mantienen su ritmo circadiano en ratas viejas, sin modificaciones con respecto al de ratas jóvenes. Y no se observan disminuciones en los niveles de dopamina en ratas viejas. Las aferencias dopaminérgicas a núcleo accumbens provienen de área tegmental ventral, al igual que las de corteza prefrontal, y esta área no muestra pérdida neuronal con el envejecimiento (Palmer y Dekasky, 1993; Barili et al., 1998), esto explicaría que los niveles de dopamina no disminuyan con el envejecimiento en esta área cerebral. Sin embargo esto no implica que la funcionalidad del sistema dopaminérgico de núcleo accumbens no cambie con la edad. Podrían existir cambios a nivel de receptores, de respuesta asociada a receptor o de transportadores. De hecho se ha descrito que la actividad del transportador de dopamina en núcleo accumbens está aumentada en ratas viejas (Yoshimoto, 2001).

La acetilcolina muestra un ritmo circadiano con un máximo de sus concentraciones en el periodo de oscuridad. El ritmo circadiano de acetilcolina en el núcleo accumbens no ha sido descrito previamente. La acetilcolina mediada mediante la técnica de microdiálisis se considera de origen neuronal ya que es sensible a TTX y dependiente de Ca^{2+} (Pepeu y Giovannini, 2004), las neuronas colinérgicas de núcleo accumbens son interneuronas (Cuello y Sofroniew, 1984). Así pues la actividad de estas interneuronas varía de manera circadiana y con ello la regulación que ejerce sobre otros sistemas neurotransmisores.

En ratas viejas el ritmo circadiano de acetilcolina se pierde. Se ha descrito una disminución del número de interneuronas colinérgicas en el núcleo accumbens (Muir, 1997), sin embargo los niveles de acetilcolina no son distintos en ratas viejas comparadas con ratas jóvenes. Esta falta de diferencia puede ser debida a algún mecanismo compensatorio que sin embargo no fuera suficiente para que las concentraciones extracelulares mostraran un ritmo circadiano. Por otro lado la melatonina regula los niveles de acetilcolina en el núcleo accumbens, se ha descrito que una perfusión local de melatonina en esta área aumenta los niveles de acetilcolina

(Paredes et al., 1999). Es posible que esta regulación se lleve a cabo a través de receptores específicos ya que se ha mostrado mRNA de receptor de melatonina en el núcleo accumbens de ratón (Morgan et al., 1994). Los niveles de melatonina están disminuidos en las ratas viejas (Savanska, 2004).

El ritmo circadiano de acetilcolina es el único que se modifica en núcleo accumbens pero si cambian las interneuronas, cambia la regulación de toda la estructura, luego la actividad circadiana del núcleo accumbens se ve modificada con el envejecimiento.

5.4. Efecto del envejecimiento sobre el ritmo circadiano de actividad motora.

La actividad motora muestra un ritmo circadiano en ambos grupos de edad. En ratas viejas tanto la amplitud como el mesor de su ritmo circadiano de actividad motora son menores que en ratas jóvenes. Además se observa una disminución en la actividad motora en animales viejos, pero esta disminución sólo se produce en las fases de oscuridad, lo que concuerda con la disminución de la amplitud.

Los cambios en los ritmos circadianos de actividad motora debidos al envejecimiento son debidos a cambios en el núcleo supraquiasmático, ya que el ritmo circadiano de actividad motora depende del núcleo supraquiasmático (Carlson, 1999; Moore, 1999). Algunos autores sugirieron una neurodegeneración en el núcleo supraquiasmático como causa de las alteraciones de los ritmos circadianos en el envejecimiento (Swaab et al., 1985). Sin embargo estudios posteriores mostraron que el número de células, tanto astrocitos como neuronas, no son diferentes entre animales jóvenes y viejos (Madeira et al., 1995). Sí se han encontrado cambios en la inervación dopaminérgica y colinérgica del núcleo supraquiasmático, implicadas en la sincronización del ritmo circadiano de este núcleo (Hofman, 2000). De hecho se ha descrito que una lesión de los terminales colinérgicos que inervan al núcleo supraquiasmático en ratas jóvenes produce una disminución de la amplitud y el mesor del ritmo circadiano de actividad motora y una disminución de la amplitud del ritmo de temperatura (Endo et al., 2001), cambios similares a los producidos por el envejecimiento.

También se ha descrito disminución en la amplitud de la actividad neuronal de núcleo supraquiasmático (Hofman, 2000; Pandi-Perumal et al., 2001; Yamazaki et al., 2002). Por lo tanto la disminución en la amplitud que observamos puede ser debida a la disminución de la actividad de las neuronas del núcleo supraquiasmático junto a las alteraciones de las inervaciones acetilcolinérgicas a este núcleo. Estas últimas estarían implicadas también en la disminución del mesor observada. Otros estudios describen esta disminución de la amplitud, con una disminución de los niveles de actividad en el periodo de luz y un incremento de la actividad en periodos de luz (Martín et al., 1986; Dawson y Crowne, 1988). En nuestros resultados no se observa este incremento de la actividad en el periodo de luz, posiblemente porque los cambios en el periodo de oscuridad son más pronunciados que los que ocurren en los periodos de luz (Peng et al., 1980; Casadesus et al., 2001). Casadesus et al. (2001) tampoco encuentran este aumento en el periodo de luz y lo atribuyen a un *floor effect* debido a que los niveles de actividad observados en este periodo en ambos grupos son muy bajos.

Otra de las características del ritmo circadiano de actividad motora en ratas viejas es el acortamiento de su periodo en curso libre (Mailloux, 2001), probablemente reflejo del acortamiento en el periodo del ritmo circadiano de las neuronas del núcleo supraquiasmático ya que la expresión de uno de los genes implicados en la generación de los ritmos circadianos, *mPer 1*, en estas neuronas muestra un ritmo en curso libre con un periodo más corto en

animales viejos (Yamazaki et al., 2002). Nosotros no observamos alteraciones en el periodo del ritmo circadiano de actividad motora pero esto es debido a que nuestros animales no se encuentran en curso libre, sino sincronizados por un ciclo 12 horas oscuridad/ 12 horas luz.

Discusión

1. Acerca de los métodos

1.1. Sobre la microdiálisis cerebral

La microdiálisis es una de las técnicas más extendidas para investigar *in vivo* la dinámica de neurotransmisores en áreas específicas del cerebro (Ungerstedt, 1991; Westerink, 1995). La microdiálisis pretende imitar el funcionamiento de un capilar sanguíneo. Se perfunde un líquido a través de un tubo de microdiálisis produciéndose un intercambio de sustancias, a través de la membrana de microdiálisis, entre el líquido extracelular y el de perfusión (Ungerstedt, 1991). Se aprovecha este intercambio de moléculas a través de la membrana para recoger y medir sustancias neuroquímicas presentes en el líquido extracelular. En el uso de esta técnica hay que tener en cuenta que:

- La composición del dializado obtenido no es igual a la del líquido extracelular. Hay que tener en cuenta lo que se denomina recuperación de la cánula. El paso de sustancias químicas a través de la membrana depende de su coeficiente de difusión, de la longitud de la membrana, de la composición del líquido de perfusión, de las propiedades de la membrana y de la temperatura (Benveniste et al., 1989; Ungerstedt, 1991). A mayor recuperación, mayor sensibilidad, es decir, mayor capacidad para medir las pequeñas variaciones en la composición del líquido extracelular. En el presente trabajo de investigación se utiliza como líquido de perfusión líquido cefalorraquídeo sintético lo más parecido posible al líquido del medio extracelular, un flujo de perfusión muy bajo (1.25-1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$), la membrana está compuesta por materiales inertes (cuprofano) y tiene una longitud de 2-4 mm.

- La microdiálisis es una técnica invasiva. La introducción de la cánula provoca un periodo inicial de perturbación de los niveles de neurotransmisores y cambios inflamatorios y metabólicos así como gliosis en el área a partir de las 48-72 horas de introducción de la cánula (Benveniste, 1989; Benveniste y Hansen, 1991; Ungerstedt, 1991). Sin embargo, la implantación de cánulas guías en este trabajo de investigación, permite la introducción de la cánula de microdiálisis en tejido “fresco”, lo que evitaría los inconvenientes tanto fisiológicos como patológicos que acabamos de mencionar. Las muestras se empiezan a recoger 3 horas después de la introducción de la cánula, tiempo suficiente para la estabilización de los niveles de las sustancias que vamos a medir y los experimentos duran un máximo de 27 horas (tiempo de estabilización incluido) con lo que la gliosis no se llega a producir durante el experimento.

- En la microdiálisis pueden utilizarse animales anestesiados o despiertos. Aunque la realización de ciertos experimentos muy complejos requiere la utilización de animales anestesiados, para los estudios farmacológicos y comportamentales se requiere la utilización de un animal despierto. Los inconvenientes de trabajar con un animal despierto y en movimiento son su sensibilidad a los estímulos ambientales, el momento del ciclo circadiano en que se encuentre y además tiene que estar recuperado del trauma quirúrgico y de los efectos de la anestesia (Ungerstedt, 1991). Estos problemas pueden minimizarse habituando al animal a ser manipulado, a la jaula de experimentación, controlando las variables ambientales y dejando tiempo suficiente para que se recupere de la operación. Ha sido estimado un tiempo de 7-10 días para la completa recuperación fisiológica de los animales (Gisolfi y Mora, 2000). En este trabajo de investigación transcurren entre 10 y 15 días entre la operación y el experimento de diálisis. Para asegurarnos que el animal ha recuperado su ritmicidad circadiana se mide su actividad motora espontánea durante un ciclo de 24 horas a los 10 días de la operación. En el caso particular del estudio de los ritmos circadianos, la luz, la

temperatura y la disponibilidad de comida influyen fuertemente ya que son sincronizadores de estos ritmos (Murphy y Campbell, 1996). En este estudio las horas de luz y oscuridad coinciden con aquellas en las que ha sido mantenido el animal en el animalario, la temperatura es constante y la disponibilidad de comida *ad libitum* durante todo el experimento. Además un ciclo oscuridad/luz (12h/12h) y una temperatura constantes, tanto en el animalario como en la sala de experimentación, sirven para minimizar las diferencias debidas al periodo estacional en el que se realizan los experimentos.

- A la hora de estudiar los ritmos circadianos de animales viejos hay que tener en cuenta el criterio que se utiliza para determinar si un animal es viejo. En los estudios de los efectos del envejecimiento se utilizan ratas a partir de 20 meses (Segovia et al., 2001) y que pueden alcanzar más de 30 meses (Segovia et al., 1999). El problema de trabajar con ratas muy viejas es que existe una desorganización temporal muy extensa, tanto en animales en curso libre como en aquellos sincronizados con la luz, asociada con una inminente mortalidad (Mailloux et al., 1999) y esto enmascararía los efectos del proceso de envejecimiento normal. En este trabajo se utilizaron animales de 23-25 meses de edad. Los animales viejos se mantuvieron en las mismas condiciones de fotoperíodo, temperatura y disponibilidad de comida y bebida en que se mantiene a los animales jóvenes.

1.2. Sobre el análisis cromatográfico

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el procedimiento más empleado para el análisis de sustancias obtenidas mediante la técnica de microdiálisis. La HPLC permite utilizar pequeños volúmenes de muestra, métodos de derivatización simples y un reducido tiempo de análisis (Lindroth y Mopper, 1979; Venema et al., 1983; Allison et al., 1984; Fornieles et al., 1986; Cooper et al., 1984). En este trabajo de investigación el volumen de muestra extraído del experimento de microdiálisis es de 40 μl . Esta muestra se divide en tres fracciones: una de 5 μl para el análisis de aminoácidos, otra de 25 μl para el análisis de catecolaminas y una tercera de 10 μl para el análisis de acetilcolina. Debido a los pequeños volúmenes que se manejan el análisis mediante HPLC es óptimo en nuestro caso.

El análisis de aminoácidos requiere una derivatización previa de la muestra. Esta derivatización aumenta la sensibilidad y selectividad del análisis. En nuestro caso elegimos la formación de OPA-derivados (Lindroth y Mopper, 1979) que da lugar a una intensa fluorescencia en un corto tiempo de reacción, aunque los compuestos que se forman son muy inestables. Para esta reacción se necesita un grupo tiol auxiliar, en este caso elegimos el mercaptopropiónico frente al tertabutiltiol porque, aunque proporciona una menor intensidad, da más estabilidad a los compuestos. Para minimizar la influencia de la inestabilidad de los compuestos en la cuantificación se estableció un tiempo constante de demora entre la adición del reactivo y la inyección de la muestra en el cromatógrafo (45 segundos). La utilización de una columna de 15 cm y la elución a través de un gradiente de tipo binario (dos fases móviles) permite optimizar la separación de los picos en un tiempo de análisis de 16 minutos. La utilización de gradientes requiere que se recuperen las condiciones iniciales antes del siguiente análisis. En nuestro sistema el tiempo de restablecimiento es de 4 minutos.

Para el análisis de monoaminas se utilizó HPLC acoplado a detección electroquímica, como este tipo de moléculas tienen potenciales de oxidación/reducción bajos, esto permite unos límites de detección en el rango de femtomoles y una elevada sensibilidad en el análisis. Sin embargo la detección electroquímica es muy sensible al flujo, por lo que este debe ser

continuo, y es menos selectiva que la detección mediante fluorescencia, ya que existen moléculas con potenciales de oxidación/reducción similares a los de las monoaminas que pueden interferir en el análisis (Anderson, 1993). En este trabajo se utilizó un detector de tipo coulométrico con dos células analíticas dispuestas en serie y una célula de guarda previa a las anteriores. Esto y la modificación de los potenciales de cada célula puede maximizar la selectividad y sensibilidad del análisis de monoaminas (Anderson, 1993). Por otro lado, la composición y pureza de la fase móvil son esenciales para optimizar la separación y resolución de los picos y reducir el ruido de la línea base. En nuestro caso, la composición de la fase móvil fue definida empíricamente modificando la concentración de sulfonato sódico y/o metanol hasta lograr una buena separación del pico de dopamina en el menor tiempo posible.

El análisis de la acetilcolina consiste en la separación de la acetilcolina y colina mediante HPLC, seguido de una reacción enzimática postcolumna y su posterior detección electroquímica. Las columnas utilizadas son microbore (BAS), que proporcionan una mayor sensibilidad y requieren un menor volumen de muestra, un tiempo de análisis más corto y un menor gasto en fase móvil, que las columnas de HPLC de fase reversa de calibre estándar (Tsai et al., 1994; Carter y Kerh, 1997). La reacción enzimática postcolumna es fundamental para la detección de estos dos compuestos, ya que ambos son difícilmente oxidados y absorben mal la luz ultravioleta. Su catálisis enzimática convierte a la acetilcolina en colina a través de la acetilcolinesterasa y esta última a través de la colinoxidasa en peróxido de hidrógeno que puede ser oxidado o reducido según el potencial aplicado. El peróxido de hidrógeno es posteriormente oxidado por un electrodo de platino, dando lugar a un potencial de corriente que es cuantificado mediante el software adecuado. Se debe evitar el sobrecrecimiento bacteriano, especialmente en el reactor enzimático, ya que si éste se contamina con bacterias que contienen la enzima catalasa, éstas convertirían el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno enmascarándose la concentración real de acetilcolina y colina. Esto se logra añadiendo un bacteriostático en la fase móvil. La concentración de neostigmina que llega al reactor enzimático no puede sobrepasar los $10\mu\text{M}$ pues produciría un efecto inhibitorio sobre la acetilcolinesterasa perdiéndose el pico de acetilcolina. En este trabajo se utilizaron concentraciones de $1\mu\text{M}$ neostigmina disueltos en el líquido cefalorraquídeo sintético.

1.3. Sobre las concentraciones extracelulares de neurotransmisores medidas mediante la técnica de microdiálisis:

La técnica de microdiálisis permite medir las concentraciones de sustancias que se encuentran en el líquido extracelular pero no en la hendidura sináptica (Timmerman y Westerink, 1997). Para interpretar los resultados de las variaciones en las concentraciones extracelulares de los neurotransmisores como índices de la actividad neuronal de los sistemas relacionados, hay que asumir que la molécula difunde desde la sinapsis y alcanza el espacio extracelular hasta llegar a la cánula de microdiálisis. Esto es posible en el caso de la dopamina y la acetilcolina, ya que su localización es exclusivamente neuronal (Seiden et al., 1993; Pepeu y Giovannini, 2004), y una vez liberada, puede difundir al medio extracelular (Garris y Wightman, 1994; Zoli y Agnati, 1996) y además se han descrito terminaciones no sinápticas que liberan dopamina y acetilcolina directamente al espacio extracelular (Verney et al., 1990; Descarries et al., 1991; Goldman-Rakic, 1998; Somogy et al., 1998). En el caso del glutamato y el GABA el origen de sus concentraciones extracelulares es controvertido, ya que además de localizarse en la neurona (como neurotransmisores), se encuentran en glía (como

intermediarios del metabolismo) (Nicholls, 1989; Nicholls, 1993; Attwell et al., 1993; Waagepetersen et al., 1999) y se ha sugerido que pueden provenir también a través de la barrera hematoencefálica (Timmerman y Westerink, 1997). Las sinapsis de glutamato y GABA están rodeadas de astrocitos con una alta densidad de transportadores, mayor incluso que la de la terminación neuronal presináptica (Rothstein et al., 1996). El neurotransmisor liberado es recaptado rápidamente por estos transportadores y esto hace difícil su difusión por el medio extracelular (Borden, 1996; Clements, 1996; Rothstein et al., 1996). Por tanto el glutamato y el GABA no parecen ser un buen índice de la liberación sináptica.

Para determinar si el origen de los neurotransmisores presentes en el líquido extracelular es sináptico, se utilizan dos criterios de liberación exocitótica: la dependencia de estas concentraciones de la apertura de canales rápidos de sodio, que se bloquea con tetrodotoxina (TTX), y la dependencia de apertura de canales de calcio (Timmerman y Westerink, 1997; Del Arco et al., 2001). En el caso de la dopamina y la acetilcolina, varios autores han descrito que sus concentraciones disminuyen al perfundir TTX o al restringir la disponibilidad de calcio. Esto apoya que estas concentraciones extracelulares son de origen sináptico y reflejan la actividad de los sistemas catecolaminérgicos (Timmerman y Westerink, 1997; Pepeu y Giovannini, 2004).

En el caso de las concentraciones extracelulares de glutamato y GABA, pocos estudios han mostrado una modificación en las concentraciones extracelulares basales de estos aminoácidos tras la perfusión de TTX o la restricción de la disponibilidad de calcio y los que han encontrado una disminución, ésta está alrededor del 40-50 % (Timmerman y Westerink, 1997; Del Arco et al., 2001). Ello sugiere que gran parte de estas concentraciones no se deben a la actividad exocitótica de las neuronas y probablemente no reflejen una liberación desde las terminaciones presinápticas. Por otro lado, los aumentos en las concentraciones extracelulares de glutamato y GABA producidos por diversas manipulaciones experimentales, sí son dependientes de TTX y de la disponibilidad de calcio. Se han encontrado variaciones en las concentraciones extracelulares de estos neurotransmisores tras la estimulación química o eléctrica lejos de donde se registra con la cánula de microdiálisis (Timmerman y Westerink, 1995; Lada, 1998; You, 1998) o cambios en estas concentraciones tras estimulación conductual (estrés y aprendizaje) (Moghaddam, 1993; Keefe et al., 1993; Miele et al., 1996; Del Arco, 2001). Esto indicaría una liberación exocitótica desde la neurona. Sin embargo, estudios recientes sobre la interacción neurona-glia han mostrado que el astrocito también puede liberar GABA y glutamato desde vesículas de una forma TTX dependiente al ser estimulados por neuronas glutamatérgicas (Araque et al., 1999; Haydon et al., 2000; Parpura y Haydon, 2000). Por tanto, aunque la fuente del glutamato y del GABA extracelular obtenido mediante la microdiálisis intracerebral *in vivo* sigue siendo controvertida actualmente, sí parece claro que son un índice de la actividad de los sistemas glutamatérgico y GABAérgico (Timmerman y Westerink, 1997; Obrenovitch, 1998; Del Arco, 2001).

2. Acerca de los resultados

2.1. Sobre el origen y regulación de los ritmos circadianos de neurotransmisores en la corteza prefrontal.

Los neurotransmisores glutamato, dopamina y acetilcolina presentan ritmos circadianos en la corteza prefrontal con un máximo en el periodo de oscuridad. No se observan variaciones circadianas en las concentraciones extracelulares de GABA.

En la corteza prefrontal existen importantes concentraciones de glutamato que provienen de aferencias del tálamo y de otras áreas de corteza (Peinado y Mora, 1986). El GABA se encuentra distribuido homogéneamente y en elevadas concentraciones y proviene de interneuronas (Van Eden et al., 1987; Descarries et al., 1991; DeFelipe y Fariñas, 1992). La dopamina proviene de aferencias dopaminérgicas que se originan en el área tegmental ventral, y la acetilcolina de aferencias provenientes de telencéfalo basal y, en menor medida, de interneuronas (Berger et al., 1991; Fuster et al., 1997).

Tres de los neurotransmisores principales de la corteza prefrontal, glutamato, dopamina y acetilcolina varían según un ritmo circadiano, y el principal neurotransmisor inhibitor, GABA, cuyas concentraciones extracelulares no varían a lo largo de un ciclo de 24 horas, muestra un ritmo circadiano en la densidad de sus receptores postsinápticos (Kanterewicz et al., 1995). El GABA, además, se encuentra en interneuronas con lo que esta variación de la densidad de receptores regularía la actividad del circuito. Esto sugiere que la actividad basal de la corteza prefrontal estaría regulada de manera circadiana, siendo su actividad mayor durante el periodo de oscuridad, que coincide con el periodo de actividad de la rata. Precisamente, algunas de las funciones en la que está implicada la corteza prefrontal están sujetas a variaciones circadianas como la memoria de trabajo (Monk et al., 1997; Wright et al., 2002), el estado de ánimo (Owens et al., 2000; Adan y Sánchez-Turet, 2001) o la atención (Kraemer et al. 2000). Además la alteración del patrón circadiano normal debido a turnos rotatorios de trabajo, viaje a través de zonas horarias, envejecimiento, etc..., afecta a la memoria a corto plazo, la atención (Cho et al., 2000) y el estado de ánimo (Florida-James et al., 1996).

La regulación de esta actividad circadiana podría producirse de forma endógena, por parte del núcleo supraquiasmático. De hecho se ha descrito una vía multisináptica que conecta al núcleo supraquiasmático con la corteza prefrontal vía núcleo paraventricular del tálamo (Sylvester et al., 2002). Una de las principales características de los ritmos circadianos endógenos es su mantenimiento en condiciones de ausencia de luz.

Al variar el fotoperíodo a los animales de experimentación se observó que el ritmo circadiano de glutamato es dependiente de la presencia de luz, mientras que el de dopamina mantiene su ritmo circadiano en ausencia de luz. El ritmo circadiano de GABA no fue estudiado en estas condiciones al no haberse observado un ritmo circadiano de sus concentraciones extracelulares, sin embargo se ha descrito que las variaciones circadianas en el número y afinidad de receptores GABA en el sistema nervioso central se mantienen en oscuridad continua y se pierden tras la lesión bilateral del núcleo supraquiasmático (Wirz-Justice, 1987; Kafka et al., 1985). Tampoco el ritmo circadiano de acetilcolina se estudió en las condiciones de fotoperíodo modificado, debido a que en ese momento la técnica para detectar acetilcolina no estaba disponible en nuestro laboratorio. Con todo, Kametani y

Kawamura (1991) describieron que el ritmo circadiano de acetilcolina en corteza prefrontal se mantiene en condiciones de oscuridad constante.

Parece, pues, que el ritmo circadiano de los receptores de GABA, dopamina y acetilcolina son endógenos, probablemente generados por las aferencias desde núcleo supraquiasmático a la corteza prefrontal. Aunque en el caso de dopamina y acetilcolina también es posible que esta regulación se realice a través de los núcleos mesencefálicos origen de sus fibras aferentes a corteza.

Uno de las principales eferencias del núcleo supraquiasmático y mensajero hormonal de este núcleo es la melatonina (Cassone, 1990; Redman et al., 1983; Krause y Dubocovic, 1990). Entre sus múltiples acciones, la melatonina actúa como modulador de muchas de las funciones del cerebro (Reiter, 1989). Existe la posibilidad de que el reloj endógeno regule el ritmo circadiano de neurotransmisores en corteza prefrontal a través de la melatonina, además de a través de su conexión nerviosa.

La perfusión local de melatonina durante el periodo de luz y siguiente periodo de oscuridad alteró los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en la corteza prefrontal.

En el caso del glutamato no podemos decir que el núcleo supraquiasmático regule su ritmo circadiano ya que, como hemos visto en el bloque 1, es dependiente de la luz. La luz podría regular el ritmo circadiano de glutamato a través de la conexión descrita de retina a núcleos del rafe (Meijer y Rietvelt, 1989; Morin, 1994) y de rafe a corteza prefrontal (Uyling y Van Eden, 1990), ya que la serotonina en corteza prefrontal interacciona tanto con la neurotransmisión glutamatérgica como con la función astrocitaria. Por otro lado, la luz actúa sobre los ritmos circadianos a través de la melatonina (Reiter, 1991), un pulso suficientemente largo y de suficiente intensidad inhibe la síntesis y liberación de melatonina (Erren et al., 2003). La melatonina disminuye la actividad de los astrocitos (Baydas et al. 2003) y las concentraciones extracelulares de glutamato dependen de la actividad de estas células. Así pues la luz inhibiría la síntesis de melatonina, liberando a los astrocitos de su inhibición, aumentando la recaptura de glutamato y disminuyendo sus concentraciones extracelulares. En ausencia de luz la melatonina se mantiene más tiempo elevada en el medio extracelular y estando más tiempo los astrocitos inhibidos, lo que altera el ritmo circadiano. Disminuir la actividad de los astrocitos, implica disminuir la recaptura de glutamato por parte de estas células.

El hecho de que la perfusión continua de melatonina rompa los ritmos circadianos de dopamina y acetilcolina sugiere que la regulación de su ritmo circadiano se realiza, al menos en parte, por la melatonina. Sin embargo en condiciones de oscuridad continua, en las que la melatonina se mantiene elevada más tiempo, ambos ritmos se mantienen. Por lo que los ritmos circadianos de dopamina y acetilcolina estarían bajo una doble regulación, una directa desde el núcleo supraquiasmático a través de la vía nervios que conecta ambas estructuras, y una indirecta a través de los niveles de melatonina.

2.2. Sobre la relación entre los ritmos circadianos de neurotransmisores en la corteza prefrontal y el ritmo circadiano de actividad motora

Los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina en corteza prefrontal y el de actividad motora tienen un perfil temporal común, lo que podría sugerir una relación entre ambos ritmos.

El ritmo circadiano de glutamato en la corteza prefrontal no parece relacionado con el ritmo circadiano de actividad motora, ya que se ha demostrado que este último es endógeno, dependiente del núcleo supraquiasmático (Meijer y Rietveld, 1989; Schwartz y Zimmerman, 1990), y el ritmo circadiano de glutamato es dependiente de la presencia de luz.

Por el contrario los ritmos de dopamina y acetilcolina son endógenos, ya que se mantienen en ausencia de luz (bloque 2, Kametani y Kawamura, 1991), al igual que el de actividad motora. Sin embargo el hecho de que la melatonina, perfundida localmente en la corteza prefrontal, altere los ritmos circadianos de neurotransmisores en esta área y no el ritmo circadiano de actividad motora, no apoya que exista una relación causal entre ambos ritmos, ya que se ha descrito que una inyección intraperitoneal de melatonina modifica el ritmo circadiano de actividad motora. De hecho los niveles de dopamina en la corteza prefrontal no se correlacionan con los niveles de actividad motora (O'Neill y Fillenz, 1985), mientras que sus niveles en estriado y núcleo accumbens si se correlacionan con la actividad motora (O'Neill y Fillenz, 1985; Paulson y Robinson, 1994). Esto sugeriría que el sistema dopaminérgico de la corteza prefrontal estaría más relacionado con otras funciones. Se ha sugerido que este neurotransmisor en la corteza prefrontal tendría un papel en la regulación de la memoria de trabajo y otras funciones cognitivas (Robbins, 2000).

En el caso de la acetilcolina, varios estudios muestran que su liberación en la corteza cerebral está relacionado con el nivel de arousal del animal. En consonancia con esto, se ha descrito un incremento en la liberación de acetilcolina durante la actividad motora espontánea o la alerta del animal tras distintos estímulos sensoriales (Day et al., 1991). De hecho, Mitshusima et al, muestran una correlación entre los niveles de acetilcolina en corteza prefrontal y actividad motora espontánea en ratas jóvenes pero no en ratas viejas. Sin embargo otros autores no confirman esta correlación (Day y Fibiger, 1992; Moore et al, 1992; Giovannini et al., 2001), y sugieren que esta relación podría estar enmascarada debido a la gran cantidad de funciones asociadas a la liberación de acetilcolina, no siendo una relación directa. Además se han relacionado las concentraciones extracelulares de acetilcolina en corteza prefrontal con funciones cognitivas como los procesos atencionales o la memoria de trabajo (Muir et al., 1997; Pepeu y Giovannini, 2004).

Existe la posibilidad de que, en vez de existir una relación causal entre los ritmos circadianos de dopamina y acetilcolina y el de actividad motora, lo que cause la coincidencia de los perfiles temporales de los ritmos sea el hecho de estar bajo el mismo mecanismo de regulación. El ritmo circadiano de actividad motora está bajo el control directo del núcleo supraquiasmático (Meijer y Rietveld, 1989; Schwartz y Zimmerman, 1990) y el ritmo circadiano de dopamina y acetilcolina está regulado, en parte, por el núcleo supraquiasmático a través de su conexión con corteza prefrontal (Sylvester et al., 2002), ya que se mantienen al variar el fotoperíodo, y en parte por la melatonina, que a su vez depende del núcleo supraquiasmático (Reiter, 1989).

2.3. Sobre el efecto del envejecimiento sobre los ritmos circadianos de neurotransmisores en corteza prefrontal y ganglios basales y de actividad motora.

En el proceso de envejecimiento, el ritmo circadiano de glutamato se pierde en corteza prefrontal y estriado pero no en núcleo accumbens. Aunque no se pueden considerar las concentraciones extracelulares de glutamato un índice directo de la liberación de este neurotransmisor de sus terminales sinápticas, se ha sugerido que sería reflejo de una transmisión volumétrica que estaría regulando los circuitos en áreas específicas del cerebro, como las estudiadas en esta tesis doctoral (Del Arco et al., 2003). Las alteraciones en las variaciones circadianas de los niveles de glutamato con la edad implicarían una alteración en la regulación de los circuitos implicados, los de corteza prefrontal y estriado en este caso, y en su funcionalidad. Se ha descrito que el número de receptores NMDA es menor en ratas viejas en estas estructuras (Segovia et al., 2001), lo que implicaría un cambio de la funcionalidad del sistema glutamatérgico en la transmisión tanto sináptica como volumétrica en las tres estructuras. Recientemente se ha descrito que existe una relación entre la disminución de receptores NMDA que ocurre en sistema nervioso central en animales viejos con alteraciones en el tono muscular que podrían estar implicadas en las alteraciones del comportamiento motor en estos animales (Ossowska et al., 2001).

El ritmo circadiano de dopamina sólo se encuentra alterado en el estriado. La corteza prefrontal y el núcleo accumbens reciben aferencias del área tegmental ventral, estructura que no se encuentra afectada en cuanto a su número de neuronas, en animales viejos. Mientras que el estriado recibe aferencias de la sustancia nigra, área en la que se ha descrito una disminución de sus neuronas con el envejecimiento. Observamos además que los niveles de dopamina en el estriado en ratas viejas están muy disminuidos, lo que coincide con una pérdida de aferencia dopaminérgica en esta estructura.

Aunque se ha descrito que la lesión de área tegmental ventral y posterior mantenimiento en condiciones de luz continua producen un incremento del periodo en curso libre y una disminución de la actividad en los ritmos circadianos de actividad motora y bebida (Isobe y Nishino, 2001), esta posible regulación no parece implicada en los cambios que observamos en la actividad motora con el envejecimiento normal ya que no observamos alteraciones en las concentraciones extracelulares ni en los ritmos circadianos de dopamina, ni de su metabolito HVA, ni en corteza prefrontal ni en núcleo accumbens. El estriado parece estar implicado en los cambios que observamos en la actividad motora de animales viejos ya que se observa una gran alteración de su sistema dopaminérgico. Además se ha descrito que los niveles de dopamina de estriado se correlacionan con los niveles de actividad motora (O'Neill y Fillenz, 1985; Paulson y Robinson, 1994) y que lesiones con reserpina producen un descenso de niveles de dopamina en estriado, y cambios en los ritmos circadianos similares a los producidos por el envejecimiento, entre ellos una disminución de la actividad motora pero no los cambios en la amplitud (Turek et al., 1995). Entonces, la dopamina en estriado podría estar relacionada con los niveles de actividad motora, ya que en ratas viejas las concentraciones de dopamina disminuyen mucho y uno de los principales cambios observados en ratas viejas es la disminución de sus niveles de actividad motora. Se ha sugerido una posible relación entre la actividad estriatal y la regulación del ciclo sueño vigilia, ya que lesiones en esta estructura producen fragmentación en la fase de sueño del ciclo, similar a la que ocurre en ancianos y enfermos de Parkinson, que muestran una degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal (Mena-Segovia et al., 2002).

El área tegmental ventral proyecta a sistema límbico, entre otras estructuras a núcleo supraquiasmático, a través de la vía mesolímbica, que está implicada en la regulación de funciones emocionales. También envía proyecciones a corteza prefrontal, a través de la vía mesocortical, relacionada con funciones cognitivas (Robbins, 2000). En etapas avanzadas de la enfermedad de parkinson, la neurodegeneración que afecta a sustancia negra se extiende a área tegmental ventral. Mientras que la neurodegeneración de la sustancia negra y la alteración de la vía nigroestriatal se relaciona con los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson (Armegol, 1998), la neurodegeneración del área tegmental ventral se relaciona con los síntomas no motores de esta enfermedad. Las alteraciones de la vía mesolímbica con síntomas emocionales como la depresión y las producidas en la vía mesocortical con síntomas cognitivos como el enlentecimiento cognitivo (Eshuis y Leenders, 2001). Sin embargo, el hecho de que existan síntomas cognitivos en los primeros estadios de la enfermedad, en los que área tegmental ventral todavía no está afectada, ha llevado a sugerir que el sistema dopaminérgico estriatal podría estar implicado en funciones cognitivas (Nieoullon et al., 2002).

El ritmo circadiano de acetilcolina está modificado en corteza prefrontal y en núcleo accumbens, mientras que en estriado no hemos observado dicho ritmo circadiano ni modificaciones con la edad. A pesar de que, como se ha discutido en el apartado anterior, el ritmo circadiano de acetilcolina en corteza prefrontal no está directamente relacionado con el ritmo circadiano de actividad motora, observamos que tanto el ritmo circadiano de acetilcolina como el de actividad motora muestran una amplitud y unos niveles menores en ratas viejas. Se ha descrito una disminución en el número de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal, que son las que inervan a la corteza prefrontal (Gallagher y Colombo, 1995; Muir, 1997). Esto explicaría los niveles más bajos de acetilcolina en ratas viejas, pero no la disminución en la amplitud del ritmo. Endo et al. (2001) describen que la lesión de neuronas acetilcolinérgicas del telencéfalo basal producen cambios similares a los producidos por el envejecimiento en la actividad motora de ratas viejas. De hecho el sistema colinérgico del telencéfalo basal está implicado en la regulación de la actividad del núcleo supraquiasmático ya que existen conexiones nerviosas entre ambas estructuras (Bina et al., 1993), se han descrito receptores colinérgicos en el núcleo supraquiasmático (Van der Zee et al., 1991) y la perfusión de agonistas colinérgicos en esta estructura produce una modificación de fase en la actividad circadiana del reloj endógeno (Ferguson et al., 1999). Así la disminución de neuronas colinérgicas en telencéfalo basal podría ser la causante de la disminución de la amplitud de los ritmos circadianos de actividad motora y de acetilcolina en corteza prefrontal en ratas viejas al estar modificada la regulación colinérgica del núcleo supraquiasmático; y de la disminución de niveles de acetilcolina en la corteza prefrontal al llegar menos aferencias colinérgicas desde telencéfalo basal.

En estriado y núcleo accumbens, la acetilcolina proviene de interneuronas en ambos casos, pero está influenciada diferentemente por el envejecimiento. En el caso del estriado no se observan cambios y se ha descrito que aunque los niveles basales de acetilcolina no están alterados en animales viejos, la liberación estimulada de este neurotransmisor si está disminuida (Weiler et al, 1999), estando la respuesta de las interneuronas comprometida en esta área. Los niveles de acetilcolina en estriado se han relacionado principalmente con actividad motora (Day et al., 1991) aunque algún trabajo sugiere una relación con procesos corticales (Stemmelin, 2002). En el núcleo accumbens se pierde el ritmo circadiano, y por tanto la regulación circadiana que la interneuronas acetilcolinérgicas ejercen sobre la actividad de esta estructura. Paredes et al., (1999) encuentran una relación entre la acetilcolina en núcleo accumbens y cambios en la actividad motora. Así que es posible que los cambios

observados en acetilcolina en esta estructura con la edad influyan en la alteración de la regulación de la actividad motora en animales viejos.

En resumen, la disminución de la actividad motora observada en animales viejos estaría principalmente relacionada con las alteraciones en estriado, sobre todo del sistema dopaminérgico. Mientras que los cambios en la amplitud del ritmo de actividad motora serían debidos a cambios en el núcleo supraquiasmático, posiblemente a la disminución de su inervación colinérgica. Este mecanismo sería también responsable de los cambios observados en la acetilcolina en corteza prefrontal. Estos cambios en la acetilcolina de corteza prefrontal, así como su interacción con el sistema dopaminérgico de esta estructura, estarían relacionados con los cambios en memoria de trabajo y procesos atencionales descritos en individuos y animales de avanzada edad (Muir, 1997; Robbins, 2000; Mattsson et al., 2002; West et al., 2002; Pepeu y Giovannini, 2004).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las concentraciones extracelulares de glutamato, pero no de GABA, muestran un ritmo circadiano en la corteza prefrontal de la rata, que es dependiente de la presencia de luz y está regulado, en parte, por la melatonina.
2. La actividad dopaminérgica y colinérgica muestra un ritmo circadiano en la corteza prefrontal que es independiente de la presencia de luz y está regulado, en parte, por la melatonina.
3. Los ritmos circadianos de glutamato, dopamina y acetilcolina no están implicados en la regulación del ritmo circadiano de la actividad motora espontánea.
4. En la corteza prefrontal, el proceso de envejecimiento rompe el ritmo circadiano de glutamato, no modifica el ritmo circadiano de dopamina y disminuye la amplitud del ritmo circadiano de acetilcolina así como los niveles de este neurotransmisor.
5. En el estriado, el proceso de envejecimiento rompe el ritmo circadiano de glutamato y dopamina, y disminuye los niveles de dopamina.
6. En el núcleo accumbens, el proceso de envejecimiento no modifica el ritmo circadiano de glutamato y dopamina, pero rompe el ritmo de acetilcolina.
7. El proceso de envejecimiento disminuye la amplitud y el mesor del ritmo circadiano de actividad motora espontánea.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo,D., Rosenstein,R.E., Romeo,H.E. y Cardinali,D.P. Changes in gamma-aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendocrinology* **43**, 24-31 (1986).
- Adan,A. y Sanchez-Turet,M. Gender differences in diurnal variations of subjective activation and mood. *Chronobiol. Int.* **18**, 491-502 (2001).
- Albers,H.E., Liou,S.-Y., Stopa,R.T. y Zoellers R.T. Neurotransmitters colocalization and circadian rhythms. *Prog. Brain Res.* **92**, 298-307 (1992).
- Allison,L.A., Mayer,G.N. y Shoup,R.E. O-phthalaldehyde derivates of amines for high speed liquid chromatography electrochemistry. *Ann. Chem.* **56**, 1089-1096 (1984).
- Amenta,F., Bronzetti,E., Sabbatini,M. y Vega,J.A. Astrocyte chages in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study. *Microscopu Research and Technique* **43**, 29-33 (1998).
- Anderson,G.M. High performance liquid chromatography analysis of monoamines and metabolites in body fluids. En: High performace liquid chromatography in neuroscience research. Holman,R.B., Cross,A.J. y Joseph,M.H. (eds.), pp. 55-88 John Wiley&Sons,Ltd., Chichester, England (1993).
- Andres,M.E., Gysling,K. y Bustos,G. Differential regulation of dopamine release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum after partial and extreme lesions of the nigro-striatal pathway. *Brain Res.* **797**, 255-266 (1998).
- Araque,A., Parpura,V., Sanzgiri,R.P. y Haydon,P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* **22**, 208-215 (1999).
- Ariznavarreta,C., Villanúa,M.A., Cardinali,D.P. y Tresguerres,J.A.F. Ritmos Biológicos. En: El espectro bipolar. Palomo,T., Beninger,R.J., Jiménez-Arriero,M.A. y Huertas,E. (eds.), pp. 211-240 Editorial CYM, Madrid,(2002).
- Armengol,J.A. Manual de Neurociencia. Delgado,J.M., Ferrús,A., Mora,F. y Rubia,F.J. (eds.), pp. 393-431 Editorial Síntesis, Madrid (1998).
- Artigas,F. Manual de Neurociencia. Delgado,J.M., Ferrús,A., Mora,F. y Rubia,F.J. (eds.), pp. 201-229 (Editorial Síntesis, Madrid,1998).
- Aston-Jones,G., Rogers,J., Shaver,R.D., Dinan,T.G. y Moss,D.E. Age-impaired impulse flow from nucleus basalis to cortex. *Nature* **318**, 462-464 (1985).
- Attwell,D., Barbour,B. y Szatkowski,M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* **11**, 401-407 (1993).
- Awapara,J., Landua,A.J., Fuerst,R. y Seale,B. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* **187**, 35-39 (1950).

- Barili,P., De Carolis,G., Zaccheo,D. y Amenta,F. Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review. *Mech. Ageing Dev.* **106**, 57-92 (1998).
- Baskys,A. y Remington,G. Brain mechanisms and psychotropic drugs. Baskys,A. & Remington,G. (eds.), pp. 55-71 (CRC Press, New York,1996).
- Baydas,G., Reiter,R.J., Yasar,A., Tuzcu,M., Akdemir,I. y Nedzvetskii,U.S. Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of the streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 797-804 (2003).
- Benstaali,C., Mailloux,A., Bogdan,A., Auzeby,A. y Touitou,Y. Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents. Their relationship with the light-dark cycle. *Life Sci.* **68**, 2645-2656 (2001).
- Benveniste,H. Brain microdialysis. *J. Neurochem.* **52**, 1667-1679 (1989).
- Benveniste,H. y Hansen,A.J. Practical aspects of using microdualisys for determination of brain interstitial concentrations. En: *Microdiaslysis in the Neurosciences*. Robinson,T.E. & Justice,J.B. (eds.), pp. 81-102 Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1991).
- Berger,B., Gaspar,P. y Verney,C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *Trends Neurosci.* **14**, 21-27 (1991).
- Bina,K.G., Rusak,B. y Semba,K. Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that projects to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in the rat. *J.Comp.Neurol.* **335**, 295-307 (1993).
- Borden,L. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem. Int.* **29**, 335-356 (1996).
- Bormann,J. y Feigenspan,A. GABA_A receptors. *Trends Neurosci.* **18**, 515-519 (1995).
- Bradford,H.F. Fundamentos de neuroquímica. Labor, Barcelona (1988).
- Brady,J. Biological Clocks. Edward Arnold Publishers, London (1979).
- Bunin,M.A. y Wightman,R.M. Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends Neurosci.* **22**, 377-382 (1999).
- Burk,J.A., Herzog,C.D., Porter,M.C. y Sarter,M. Interaction between aging and cortical cholinergic deafferentation on attention. *Neurobiol. Aging* **23**, 467-477 (2002).
- Buzsaki,G., Bickford,R.G., Armstrong,D.M., Ponomareff,G., Chen,K.S., Ruiz,R., Thal, L.j. y Cage,F.H. Electric activity in the neocortex of freely moving young and age rats. *Neuroscience* **26**, 735-744 (1988).
- Cardinali,D.P. Ritmos biológico. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres,J.A.F. *et al.* (eds.), pp. 1133-1147 McGraw-Hill. Interamericana., Madrid (1999).
- Carlson,N.R. Fisiología de la conducta., pp. 334-343 Ariel neurociencia, Barcelona (1999).

- Carpenter, G.A. y Grossberg, S. A neural theory of circadian rhythms: Aschoff's rule in diurnal and nocturnal mammals. *Am. J. Physiol.* **247**, R1067-R1082 (1984).
- Carr, D.B. y Sesack, S.R. Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J. Neurosci.* **20**, 3864-3873 (2000).
- Carter, A.J. y Kehr, J. Microbore high performance liquid chromatographic method for measuring acetylcholine in microdialysis samples: optimizing performance of platinum electrodes. *Journal of Chromatography B* **692**, 207-212 (1997).
- Casadesus, G., Shukitt-Hale, B. y Joseph, J.A. Automated measurement of age-related changes in the locomotor response to environmental novelty and home-cage activity. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1887-1897 (2001).
- Cassone, V.M., Chesworth, M.J. y Armstrong, S.M. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injections of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.* **36**, 1111-1121 (1986).
- Cassone, V.M. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci.* **13**, 457-464 (1999).
- Castañeda, T.R., Marquez de Prado, B., Prieto, D. y Mora, F. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J. Pineal Res.* **36**, 117-185 (2004).
- Cermakian, N. y Sassone-Corsi, P. Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 359-365 (2002).
- Cho, K., Ennaceur, A., Cole, J.C. y Suh, C.K. Chronic jet lag produces cognitive deficits. *J. Neurosci.* **20**, RC66(1-5) (2000).
- Clements, J.D. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci.* **19**, 163-171 (1996).
- Cooper, J.D.H., Ogden, G., McIntosh, J. y Turnell, D.C. The stability of the o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: An investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique. *Anal. Biochem.* **142**, 98-102 (1984).
- Cooper, J.R., Bloom, F.E. y Roth, R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press, New York (1996).
- Cotman, C.W., Monaghan, D.T., Ottersen, O.P. y Storm-Mathisen, J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* **10**, 273-280 (1987).
- Cuello, A.C. y Sofroniew, M.V. The anatomy of the CNS cholinergic neurons. *Trends Neurosci.* **7**, 74-78 (1984).
- Cugini, P. Chronobiology: principles and methods. *Am. Ist. Ssuper. Sanita* **29**, 483-500 (1993).

Curtis,D.R., Phillis,J.W. y Watkins,J.C. Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* **183**, 611 (1959).

Davies,M.F. The pharmacology of gamma-aminobutyric acid system. En: Brain Mechanisms and Psychotropic Drugs. Baskys,A. y Remington,G. (eds.), pp. 101-116 CRC Press, New York (1996).

Dawson,K.A. y Crowne,D.P. Longitudinal development of activity rhythms in long evans rats. *J. Gerontol.* **43**, P85-P86 (1988)

Dawson,L.A., Nguyen,H.Q. y Li,P. The 5-HT₆ receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in rat prefrontal cortex and hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **25**, 662-668 (2001).

Day,J., Damsma,G. y Fibiger,H.C. Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **38**, 723-729 (1991).

Day,J. y Fibiger,H.C. Dopaminergic regulation of cortical acetylcholine release. *Synapse* **12**, 281-286 (1992).

De Bruin,J.P.C. Social behaviour and the prefrontal cortex. En: The prefrontal cortex: its structure, function and pathology. Uylings,H.B.M., Van Eden,C.G., De Bruin,J.P.C., Corner,M.A. & Feenstra,M.G.P. (eds.), pp. 485-497 Elsevier, Amsterdam (1990).

De Felipe,J. y Fariñas,F. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptics inputs. *Prog. Neurobiol.* **39**, 563-607 (1992).

Decker,M.W. y McGaugh,J.L. The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* **7**, 151-168 (1991).

Del Arco,A., Gisolfi,C.V. y Mora,F. Interactions of endogenous glutamate, dopamine and GABA in the prefrontal cortex of the awake rat: involvement of NMDA and AMPA/KA receptors. *Soc. Neurosci. Abst.* **24**, 2061 (1998).

Del Arco,A., Gonzalez-Mora,J.L., Armar,V.R. y Mora,F. Amphetamine increases extracellular concentrations of glutamate in striatum of the awake rat: involvement of high affinity transporter mechanisms. *Neuropharmacol.* **38**, 943-954 (1999).

Del Arco,A. Interacción entre los neurotransmisores glutamato, dopamina y GABA en la corteza prefrontal de la rata despierta: Estudios con microdiálisis. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (2000)

Del Arco,A., Segovia,G. y Mora,F. Dopamine release during stress in the prefrontal cortex of the rat decreases with age. *NeuroReport.* **12**, 4019-4022 (2001)

Del Arco,A., Segovia,G., Fuxe,K. y Mora,F. Changes of dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J. Neurochem.* **85**, 23-33 (2003).

DeLorey, T.M. y Olsen, R.W. GABA and Glycine. En: Basic Neurochemistry. Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. y Molinoff, P.B. (eds.), pp. 389-400 Raven Press, New York (1994).

Descarries, L., Lemay, B., Doucet, G. y Berger, B. Regional and laminar density of the dopamine innervation in adult rat cerebral cortex. *Neuroscience* **21**, 807-824 (1987).

Descarries, L., Séguéla, P. y Watkins, K.C. Nonjunctional relationship of monoamine axons terminals in the cerebral cortex of the adult rat. En: Volume transmission in the brain. Fuxe, K. y Agnati, L.F. (eds.), pp. 53-62. Raven Press, New York (1991).

Descarries, L., Gisiger, V. y Steriade, M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.* **53**, 603-625 (1997).

Deutch, A.Y. y Roth, R.H. Neurotransmitters. En: Fundamental neuroscience. Squire, L.R., Bloom, F.E., McConnel, S.K., Roberts, J.L., Soitzer, N.C. y Zigmon, M.J. (eds.), pp. 163-196. Academic Press, San Diego (2003).

Diez-Noguera, A. Y Cambras, T. Determinación de las características del ritmo en variables biológicas. Método Cosinor. *Inf. Med. Bio.* **3**, 25-30 (1989).

Ding, J.M., Cheng, D., Weber, E.T., Faiman, L.E., Rea, M.A. y Gillette, M.U. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shift by glutamate and NO. *Science* **266**, 1713-1717 (1994).

Dingledine, R. y McBain, C.J. Excitatory amino acids transmitters. En: Basic neurochemistry. Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. y Molinoff, P.B. (eds.), pp. 367-387 (Raven Press, New York, 1994).

Drew, A.E., Derbez, A.E. y Werling, L.L. Nicotinic receptor-mediated regulation of dopamine transporter activity in rat prefrontal cortex. *Synapse* **38**, 10-16 (2000).

Drew, J.E., Barret, P., Mercer, J.G., Moar, K.M., Canet, E., Delagrangé, P. y Morgan, P.J. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *Journal of Neuroendocrinology* **13**, 453-458 (2001).

Donoghue, J.P. y Parham, C. Afferent connections of the lateral agranular field of the rat motor cortex. *J. Comp. Neurol.* **217**, 390-404 (1983).

Dubocovich, M.L. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* **306**, 22-29 (1983).

Dubocovich, M.L., Rivera-Bermudez, M.A., Gerdin, M.J. y Masana, M.I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers in Bioscience* **8**, 1093-1108 (2003).

Edwards, E., Hampton, E., Ashby, C.R., Zhang, J. y Wang, R.Y. 5-HT₃-like receptors in the rat medial prefrontal cortex: further pharmacological characterization. *Brain Res.* **733**, 21-30 (1996).

- Eshuis,S.A. y Leenders,K.L. Parkinson's disease:symptoms and age dependency. En: Functional neurobiology of aging. Hof,P.R. y Mobbs,C.V. (eds.) pp.675-688. Academia Press, San Diego (2001).
- Endo,Y., Shinohara,K., Fueta,Y. y Irie,M. Influences of cholinergic neurotoxin ethylcholine aziridinium ion on circadian rhythms in rats. *Neurosci. Res.* **41**, 385-390 (2001).
- Erren,T.C., Reiter,R.J. y Piekarski,C. Light, timing of biological rhythms, and chronodisruption in man. *Naturwissenschaften* **90**, 485-494 (2003).
- Escames,G., Acuna-Castroviejo,D., León,J. y Vives,F. Melatonin interaction with magnesium and zinc in the response of the striatum to sensorimotor cortical stimulation in the rat. *J. Pineal Res.* **24**, 123-129 (1998).
- Escames,G., Macias,M., Leon,J., Garcia,J., Khaldy,H., Vives,F. Y Acuña-Castroviejo,D. Calcium-dependent effects of melatonin inhibition of glutamatergic response in rat striatum. *Journal of Neuroendocrinology* **13**, 459-466 (2001).
- Esquifino,A., Cano,P., Chacon,F., Reyes Toso,C.F. y Cardinali,D.P. Effercts of aging on 24-hour changes in dopamine and serotonin turnover and amino acid and somatostanine contents of rat corpus striatum. *Neurosignal* **11**, 336-344 (2002).
- Expósito,I., Mora,F. y Oaknin,S. Dopamine-glutamic acid interaction in the anterior hypothalamus: modulatory effect of melatonin. *NeuroReport* **6**, 661-665 (1995).
- Fagg,G.E. y Foster,A.C. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* **9**, 701-719 (1983).
- Feenstra,M.G.P., Botterblom,M.H.A. y Mastenbroek,S. Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience* **100**, 741-748 (2000).
- Ferguson,S.A., Kennaway,D.J. y Moyer,R.W. Nicotine phase shift the 6-sulphatoxymelatonin rhythm and induces c-fos in the SCN of rats. *Brain Res. Bull.* **48**, 527-538 (1999).
- Fibiger,H.C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci.* **14**, 220-223 (1991).
- Florida-James,G., Wallymahmed,A. y Reilly,T. Effects of nocturnal shiftwork on mood state of student nurses. *Chronobiol. Int.* **13**, 59-69 (1996).
- Fonnum,F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **42**, 1-11 (1984).
- Fonnum,F. Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **60**, 47-57 (1993).
- Fonnum,F., Storm-Mathisen,J. & Divac,I. Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibres in rat brain. *Neuroscience* **6**, 863-873 (1981).

- Fronieles,F., Peinado,J.M. y Mora,F. Endogenous levels of amino acids neurotransmitters in different regions of frontal and temporal cortex of the rat during the normal process of aging. *Neled. Supl.* **26**, 47-57 (1993).
- Foster,R.G. Seeing the light...in a new way. *J. Neuroimmunol.* **16**, 179-180 (2004).
- Fujieda,H., Scher,J., Hamadanizdeh, S.A., Wankiewicz,A.E., Pang, S.F., y Brown,G.M. Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: immunocytochemical study of mt1 melatonin receptor in guinea pig retina. *Vis. Neurosci.* **17**, 63-70 (2000).
- Furey,M.L., Pietrini,P. y Haxby,J.V. Cholinergic enhancement and increased selectivity of perceptual processing during working memory. *Science* **290**, 2315-2319 (2000).
- Fuster,J.M. The prefrontal cortex. Anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe. Lippincott-Raven, New York (1997).
- Fuster,J.M. The prefrontal cortex- an update: time is of the essence. *Neuron* **30**, 319-333 (2001).
- Gallagher,M. y Colombo,P.J. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 161-168 (1995).
- Galindo,A. Interacción de los neurotransmisores acetilcolina y dopamina en corteza prefrontal y neostriado de la rata despierta: Estudios con microdiálisis. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (2002).
- García Fernández,J.M. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neurales. En: Manual de Neurociencia. Delgado-García,J.M., Ferrús,A., Mora,F. & Rubia,F. (eds.), pp. 778-799 Síntesis, Madrid,(1998).
- Garris,P.A. y Wightman,R.M. Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetry study. *J. Neurosci.* **14**, 442-450 (1994).
- Gisolfi,C.V. y Mora,F. The Hot Brain. MIT Press, Cambridge, Massachusets (2000).
- Giovannini,M.G., Rakovska,A., Benton,R.S., Pazzagli,M., Biachi,L. y Pepeu,G. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA and glutamate release from frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience.* **106**, 43-53 (2001).
- Goldman-Rakic,P.S. Cellular and circuits basis of working memory in prefrontal cortex of non human primates. En: The prefrontal cortex:its structure, function and pathology. Uylings,H.B.M., Van Eden,C.G., De Bruin,J.P.C., Corner, M.A. y Feenstra,M.G.P. (eds.) pp.325-336. Elsevier, Amsterdam (1990).
- Goldman-Rakic,P.S. The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Adv. Pharmacol.* **42**, 707-711 (1998).
- Goldman-Rakic,P.S. The "psychic" neuron of the cerebral cortex. *Ann. NY Acad. Sci.* **868**, 13-26 (1999).

- Golombek,D.A., Pevet,P. y Cardinali,D.P. Melatonin effects on behaviour: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **20**, 403-412 (1996).
- Gorman,M.R., Goldman,B.D. y Zucker,I. Mammalian photoperiodism. En: Handbook of Behavioural Neurobiology: Circadian clock. Takahashi,J.S., Turek, F.W. y Moore, R.J. (eds.), pp.481-508. Kluwer Academics/Plenum Publisher, New York (2001).
- Groenewegen,H.J., Berendse,H.W., Wolters,J.G. y Lohman,A.S.M. The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence of parallel organization. En: The prefrontal cortex: its structure, function and pathology. Uylings,H.B.M., Van Eden,C.G., De Bruin,J.P.C., Corner,M.A. y Feenstra,M.G.P. (eds.), pp. 95-118 (Elsevier, Amsterdam,1990).
- Hasey,G.M. Acetylcholine. En: Brain Mechanisms and Psicotropic Drugs. Baskys,A. y Remington,G. (eds.), pp. 33-51 CRC Press, Boca Raton, U.S.A. (1996).
- Haus,E., Lakatua,D.J., Sackett-Lundee,L., Dumitriu,L., Nicolau,G., Petresan,E., Pliga,L. y Bogdan,C. Interaction of circadian, ultradian and infradian rhythms. En: Biological clocks. Mechanisms and applications. Touitou,Y. (ed.), pp. 141-150 Elsevier Science, New York (1998).
- Haydon,P.G., Innocenti,B., Papura,V., Araque,A., Doyle,R.T., Li,N., Mazzanti,M., Zhang,Q., Wang,Z., Sul J-Y. y Yeung,E. Astrocytic-induced, glutamate-dependent synaptic modulation. *Eur. J. Neurosci.* **12**, **Supp. 11**, 185 (2000).
- Herman,J.P. y Cullinan,W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* **20**, 78-84 (1997).
- Herzog,C.D., Nowak,K.A., Sarter,M. y Bruno,J.P. Microdialysis without acetylcholinesterase inhibition reveals an age-related attenuation in stimulated cortical acetylcholine release. *Neurobiol. Aging* **24**, 861-863 (2003).
- Hoehn,M.M. y Yahr,M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* **50**, 318-334 (1998).
- Hofman,M.A. The human circadian clock and aging. *Chronobiol. Int.* **17**, 245-259 (2000).
- Holt,D.J., Herman,M.M., Hyde,T.M., Kleinman,J.E., Sinton,C.M., German,D.C. y Graybiel,A.M. Evidence for a deficit in acetylcholine interneurons in the striatum in schizophrenia. *Neuroscience* **91**, 21-31 (1999).
- Honma,S., Katsuno,Y., Shinohara,K., Abe,H. y Honma,K.-I. Circadian rhythm and response to light of extracellular glutamate and aspartate in rat suprachiasmatic nucleus. *Am. J. Physiol.* **40**, 579-585 (1996).
- Ichikawa,J., Dai,J. y Meltzer,H.Y. 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors minimally contribute to clozapine induce acetylcholine release in rat medial prefrontal cortex. *Brain Res.* **939**, 34-42 (2002).
- Ichikawa,J., Li,Z., Dai,J. y Meltzer,H.Y. Atypical antipsychotic drug, quetiapine, iloperidone, and melperon, preferentially increase dopamine and acetylcholine release in rat medial prefrontal cortex: role of 5-HT1A receptor agonism. *Brain Res.* **956**, 349-357 (2002)

- Isobe, Y. y Nishino, H. Circadian rhythm of drinking and running-wheel activity in rats with 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area. *Brain Res.* **899**, 187-192 (2001).
- Jacobs, B.L. y Azmitia, E.C. Structure and functions of the brain serotonin system. *Physiol. Reviews.* **72**, 165-220 (1992).
- Jaliffa, C.O., Lacoste, F.F., Llomovatte, D.W., Sarmiento, M.I. y Rosenstein, R.E. Dopamine decreases melatonin content in golden hamster retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 91-95 (2000)
- Jalonen, T.O., Margraf, R.R., Wielt, D.B., Charniga, C.J., Linne, M-L. y Kimelberg, H.K. Serotonin induces inward potassium and calcium currents in rat cortical astrocytes. *Brain Res.* **758**, 69-82 (1997).
- Jansson, A., Descarries, L., Cornea-Hebert, V., Riad, M., Verge, D., Bancila, M., Agnati, L.F. y Fuxe, K. Transmitter-receptor mismatches in central dopamine, serotonin and neuropeptide system, Further evidence for volume transmission. En: *The Neuronal Environment: Brain Homeostasis in Health and Disease*. Walz, W. (ed.), pp. 83-108. Humana Press Inc., Totowa, NJ (2002).
- Jimenez-Capdeville, M.J. y Dykes, R.W. Daily changes in the release of acetylcholine from rat primary somatosensory cortex. *Brain Res.* **625**, 152-158 (1993).
- Joyce, J.N. Differential responses of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. III. Results in Parkinson's disease cases. *Brain Res.* **600**, 156-160 (1993).
- Joyce, J.N. The basal ganglia dopaminergic system in normal aging and Parkinson disease. En: *Functional neurobiology of aging*. Hof, P.R. y Mobbs, C.V. (eds.) pp.689-702. Academia Press, San Diego (2001).
- Kafka, M., Maragos, P.J. y Moore R.Y. Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Brain Res.* **327**, 344-347 (1985).
- Kalsbeek, A., Voorn, P., Buijs, R.M., Pool, C.W. y Uylings, H.B.M. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* **269**, 58-72 (1989).
- Kametani, H. y Kawamura, H. Circadian rhythm of cortical acetylcholine release as measured by in vivo microdialysis. *Neurosci. Lett.* **132**, 263-266 (1991).
- Kandel, E.R. Motivación En: *Neurociencia y Conducta*. Kandel, E.R., Jessell, T.M. & Schwartz, J.H. (eds.), pp. 653-670 Prentice Hall, Madrid (1997).
- Kanterewicz, B.I., Rosenstein, R.E., Golombek, D.A., Yannielli, P.C. y Cardinali, D.P. Diurnal variations in GABA receptor function in Syrian hamster cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **200**, 211-213 (1995).
- Keefe, K.A., Zigmond, M.J. y Abercrombie, E.D. In vivo regulation of extracellular dopamine in the neostriatum: influence of impulse activity and local excitatory amino acids. *J. Neural Transm.* **91**, 223-240 (1993).

Khaldy,H., Leon,J., Escames,G. Bijkjdaouene,L., Garcia,J.J. y Acuña-Castroviejo,D. Circadian rhythms of dopamine and dihydroxyphenil acetic acid in the mouse striatum: effects of pinealectomy and of melatonin treatment. *Neuroendocrinology* **75**, 201-208 (2002).

Kolb,B. Animals models for human prefrontal cortex-related disorders. En: The prefrontal cortex: its structure, function and pathology. Uylings,H.B.M., Van Eden,C.G., De Bruin,J.P.C., Corner,M.A. & Feenstra,M.G.P. (eds.), pp. 501-519 (Elsevier, Amsterdam,1990).

König,J.R.F. y Klippel,R.A. The rat brain. Krieger R.E., New York (1967).

Kraemer,S., Danker-Hopfe,M., Dom,H., Schmidt,A., Ehlert,I. y Hermann,W.H. Time-of-day variations of indicators of attention:performance, physiologic parameters and self assessment of sleepiness. *Biol. Psychiatry* **48**, 1069-1080 (2000).

Krause,D.N. y Dubonovich,M.L. Regulatory sites in the melatonin system of mammals. *Trends Neurosci.* **13**, 464-470 (1990).

Krnjevic,K. y Schwartz,S. Is gamma-aminobutyric acid an inhibitory transmitter? *Nature* **211**, 1372-1374 (1966).

Kuhar,M.J., Vaughan,R., Uhl,G.R., Cerruti,C., Revay,R., Feed,C., Nirenburg,M. y Pickel,V.M. Localization of dopamine transporter protein by microscopic histochemistry. *Adv. Pharmacol.* **42**, 168-170 (1998).

Lada,M.W., Vickroy,T.W. y Kennedy,R.T. Evidence for neuronal origin and metabotropic receptor-mediated regulation of extracellular glutamate and aspartate in rat striatum *in vivo* following electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J. Neurochem.* **70**, 617-625 (1998).

Lavialle,M. y Servièrè,J. Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *NeuroReport* **4**, 1243-1246 (1993).

Le Moal,M. y Simon,H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol. Rev.* **71**, 155-164 (1991).

Leonard,C.M. The prefrontal cortex of the rat: I. Cortical projections of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res.* **12**, 321-343 (1969).

Leonard,C.M. The connections of the dorsomedial nuclei. *Brain Behav. Evol.* **6**, 524-541 (1972).

Lerma,J., Herranz,A.S., Herreras,O., Muñoz,M., Solis,J.M., Del Rio,R.M. y Delgado,J.M.R. γ -aminobutyric acid greatly increases the *in vivo* extracellular taurine in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* **44**, 983-986 (1985).

Lerma,J., Herranz,A.S., Herreras,O., Abaira,V. & Martín del Río,R. *In vivo* determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* **384**, 145-155 (1986).

Lerma,J., Mora,F. y Sanchez Prieto,J. Sinapsis aminoacidérgicas y peptidérgicas. En: Manual de neurociencias. Delgado,J.M., Ferrús,A., Mora,F. & Rubia,F. (eds.), pp. 231-248 Síntesis, Madrid (1998).

- Lesauter, J. y Silver, R.J. Localization of a suprachiasmatic nucleus subregion regulating locomotor rhythmicity. *Neuroscience*. **19**, 5575-5585 (1999).
- Levi, G. y Raiteri, M. Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci.* **16**, 415-419 (1993).
- Levin, E.D. y Simon, B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* **138**, 217-230 (1998).
- Lindroth, P. y Mopper, K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amount amino acids by precolumn fluorescence derivation with o-phthaldialdehyde. *Ann. Chem.* **51**, 1667-1674 (1979).
- Lysakowski, A., Wainer, B.H., Bruce, G. y Hersh, L.B. An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience* **28**, 291-336 (1989).
- MacDonald, J.F., Martin Wojtowicz, J. y Baskys, A. Glutamate receptors. En: Brain mechanisms and psychotropic drugs. Baskys, A. & Remington, G. (eds.), pp. 117-130 (CRC Press, New York, 1996).
- Madeira, M.D., Sousa, N., Santer, R.M., Paula-Barbosa, M.M. y Gundersen, H.J.G. Age and Sex do not affect the volume, cell number, or cell size of the suprachiasmatic nucleus of the rat: an unbiased stereological study. *J. Comp. Neurol.* **361**, 585-601 (1995).
- Mailloux, A., Benstaali, C., Bogdan, A., Auzéby, A. y Touitou, Y. Body temperature and locomotor activity as marker rhythms of aging of the circadian system in rodents. *Exp. Gerontol.* **34**, 733-740 (1999).
- Maragos, W.F., Greenamyre, J.T., Penney, J.B. y Young, A.B. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci.* **10**, 65-68 (1987).
- Marquez de Prado, B., Castañeda, T.R., Galindo, A., Del Arco, A., Segovia, G., Reiter, R.J. y Mora, F. Melatonin disrupts circadian rhythms of glutamate and GABA in the neostriatum of the awake rat: a microdialysis study. *J. Pineal Res.* **29**, 209-216 (2000).
- Marquez de Prado, B., Reiter, R.J. y Mora, F. Perfusion of melatonin into the prefrontal cortex disrupt the circadian rhythm of acetylcholine but not locomotor activity. *J. Pineal Res.* **35**, 283-287 (2003).
- Martin, J.R., Fuchs, A., Reinhold, B., y Harting, J. Altered light/dark activity difference with aging in two strains. *J. Gerontol.* **41**, 2-7 (1986)
- Martin, D.L. y Rimvall, K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* **60**, 395-407 (1993).
- Martinez, A.D. y Saez, J.C. Regulation of astrocyte gap junctions by hypoxia-reoxygenation. *Brain Res. Rev.* **32**, 250-258 (2000).
- Mattsson, A., Örgren, S.O. y Olson, L. Facilitation of dopamine-mediated locomotor activity in adult rats following cholinergic denervation. *Exp. Neurol.* **174**, 96-108 (2002).

- Mazzucchelli,C., Pannacci,M., Nono,R., Lucini,V., Fraschini,F. y Stankov,B.M. The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. *Mol. Brain Res.* **39**, 117-126 (1996).
- McGeer,P.L. y McGeer,E.G. Amino acid neurotransmitters. En: Basic Neurochemistry. Siegel,G.J., Agranoff,M.D., Albers,R.W. y Molinoff,P.B. (eds.), pp. 311-332. Raven Press, New York (1989).
- Meijer,J.H. y Rietveld,W.J. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* **69**, 671-707 (1989).
- Meijer,J.H. Photic entrainment of mammals. En: Handbook of behavioural neurobiology: circadian clocks. Takahashi,J.S., Turek,F.W. y Moore,R.J. (eds.), pp.183-222. Kluwer Academics/Plenum Publisher, New York (2001).
- Mena-Segovia,J., Cintra,L., Prospero-Garcia,O. y Giordano,M. Changes in sleep-waking cycle after striatal excitotoxic lesions. *Behav. Brain Res.* **136**, 475-481 (2002).
- Miele,M., Boutelle,M.G. y Fillenz,M. The source of physiologically stimulated glutamate efflux from the striatum of conscious rats. *J. Physiol.* **497**, 745-751 (1996).
- Millan,M.J., Gobert,A., Lejeune,F., De Keyne,A., Newman-Tancredi,A., Pasteau,V., Rivet, J.M. y Cussac,D. The novel melatonin agonist agomelatina (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2c} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **306**, 954-964 (2003).
- Miller,J.D., Sanghera,M.K. y German,D.C. Mesencephalic dopaminergic unit activity in the behaviorally conditioned rat. *Life Sci.* **29**, 1255-1263 (1981).
- Miller,J.D., Farber,J., Gatz,P., Roffwarg,H. y German,D.C. Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and waking in the rat. *Brain Res.* **273**, 133-141 (1983).
- Miller,J.D., Morin,L.P., Schwartz,W.J. y Moore,R.Y. New insight into the mammalian circadian clock. *Sleep.* **19**, 641-667 (1996)
- Mishizen,A., Ikonovic,M. y Armstrong,D.M. Glutamate receptors in aging and Alzheimer's disease. En: Functional neurobiology of aging. Hof,P.R. y Mobbs,C.V. (eds.), pp.283-314. Academia Press, San Diego (2001).
- Mitsushima,D., Mizuno,T. y Kimura,F. Age-related changes in diurnal acetylcholine release in the prefrontal cortex of male rats as measured by microdialysis. *Neuroscience* **72**, 429-434 (1996).
- Mizuno,T., Endo,Y., Arita,J. y Kimura,F. Acetylcholine release in the rat hippocampus as measured by the microdialysis method correlates with motor activity and exhibits a diurnal variation. *Neuroscience* **44**, 607-612 (1991).
- Moghaddam,B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J. Neurochem.* **60**, 1650-1657 (1993).

Monk,T.H., Buysse,D.J., Reynolds III,C.F., Berga,S.L., Jarret,D.B., Begley,A.E. y Kupfer,D.J.Circadian rhythms in human performance and mood under constant conditions. *J. Sleep Res.* **6**, 9-18 (1997).

MonK,T.H. y Zee,P. Circadian rhythms, aging and dementia. En: Handbook of Behavioural Neuroscience: Circadian Clocks. Takahashi,J.S., Turek,F.W. y Moore,R.Y. (eds.) pp.603-623 Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York (2001).

Moore,H., Sarter,M. y Bruno,J.P. Age-dependent modulation of *in vivo* cortical acetylcholine release by benzodiazepine receptor ligands. *Brain Res.* **596**, 17-29 (1992).

Moore,R.J. y Leak,R.K. Suprachiasmatic nucleus. En: Handbook of behavioural neurobiology: circadian clocks. Takahashi,J.S., Turek,F.W. y Moore,R.J. (eds.) pp.141-179. Kluwer Academics/Plenum Publisher, New York (2001).

Moore,R.Y. y Eichler,V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201-206 (1972).

Moore,R.Y. Circadian timing. En: Fundamental Neuroscience. Zigmond,M.J., Bloom,F.E., Landis,S.C., Roberts,J.L. y Squire,L.R. (eds.), pp. 1189-1206. Academic Press, San Diego (1999).

Mora,F. y Myers,R.D. Brain self-stimulation: direct evidence for the involvement of dopamine in the prefrontal cortex. *Science.* **197**, 1387-1389 (1977).

Mora,F. y Ferrer,J.M.R. Neurotransmitters, pathways and circuits as the neural substrates of self-stimulation of the prefrontal cortex: facts and speculations. *Behav. Brain Res.* **22**, 127-140 (1986).

Mora,F. y Cobo,M. The neurobiological bases of prefrontal cortex self-stimulation: a review and an integrative hypothesis. En: The prefrontal cortex: its function, structure and pathology. Uylings,H.B.M., Van Eden,C.G., De Bruin,J.P.C., Corner,M.A. y Feenstra,M.G.P. (eds.), pp. 409-431. Elsevier, Amsterdam (1990).

Mora,F. y Porrás,A. Interactions of dopamine, excitatory amino acids and inhibitory amino acids in the basal ganglia of the conscious rat. En: The basal ganglia IV. New ideas and data on structure and function. Percheron,G., McKenzie,J.S. & Féger,J. (eds.), pp. 441-447. Plenum Press, New York (1994).

Mora,F. Recompensa y placer: de los mecanismos cerebrales a los procesos psicológicos. En: Hormonas, instintos y emociones. Botella Llusía,J. y Tresguerres,J.A.F. (eds.), pp. 149-156. Editorial Complutense, Madrid (1996).

Mora,F., Segovia,G. y Del Arco,A. Endogenous glutamate-dopamine-GABA interactions in specific circuits of the brain of the awake animal. En: Recent research development in neurochemistry. Pandalai,S.G. (ed.) pp.171-178. ResearchSimpost, Trivandum (1999).

Mora,F. y Sanguinetti,A.M. Diccionario de neurociencias. Alianza editorial, Madrid (2004).

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

- Morgan,P.J., Barrett,P., Howell,H.E. y Helliwell,R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* **24**, 101-146 (1994).
- Morin,L.P. The circadian visual system. *Brain Res. Rev.* **67**, 102-127 (1994).
- Murray,A.M. y Waddington,J.L. Age related in the regulation of behavior by D1/D2 dopamine receptor interactions. *Neurobiol. Aging.* **12**, 413-415 (1991).
- Mugnaini,E. y Oertel,W.H. An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. En: Handbook of chemical neuroanatomy. Vol. 4: GABA and neuropeptides in the CNS, Part I. Björklund,A. & Hökfelt,T. (eds.), pp. 436-608. Elsevier, Amsterdam (1985).
- Muir,J.L. Acetylcholine, aging and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **56**, 687-696 (1997).
- Murphy,P.J. y Campbell,S.S. Physiology of the circadian system in animals and humans. *J. Cli. Neurophysiol.* **13**, 2-16 (1996).
- Nakayama,K., Takeda,A., Hiyama,T., Yoshimuta,N. & Ushijima,S. Diurnal rhythm of 5HIAA release determined by in vivo microdialysis in freely moving rats. *The Japanese Journal of Psychiatry and Neurology* **47**, 491-493 (1993).
- Nakayama,K. Diurnal rhythm in extracellular levels of 5-hydroxyindoleacetic acid in the medial prefrontal cortex of freely moving rats: an in vivo microdialysis study. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* **26**, 1383-1388 (2002).
- Natesan,A.K. y Cassone,V.M. Melatonin receptor mRNA localization and rhythmicity in the retina of the domestic chick. *Vis. Neurosci.* **19**, 265-274 (2002).
- Nicholls,D.G. Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* **52**, 331-341 (1989).
- Nicholls,D.G. The glutamatergic nerve terminal. *Eur. J. Biochem.* **212**, 613-631 (1993).
- Nieoullon,A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog. Neurobiol.* **67**, 53-83 (2002).
- Nieto,M. y Verdú,E. Lesiones del sistema nervioso: respuesta neuronal y reparación. En: Manual de neurociencia. Delgado,J.M., Ferrús,A., Mora,F. & Rubia,F. (eds.), pp. 929-968. Síntesis, Madrid (1998).
- Norenberg,M.D. y Martínez-Hernández,A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* **161**, 303-310 (1979).
- Nowak,J.Z. y Zurawska,E. Dopamine in the rabbit retina and striatum: diurnal rhythm and effect of light stimulation. *J. Neural Transm.* **75**, 201-212 (1989).
- O'Neill,R.D. y Fillenz,M. Simultaneous monitoring of dopamine release in rat frontal cortex, nucleus accumbens and striatum: effect of drugs, circadian changes and correlation with motor activity. *Neuroscience* **16**, 49-55 (1985).

- Obata,K. y Takeda,K. Release of GABA into the fourth ventricle induced by stimulation of the cat cerebellum. *J. Neurochem.* **16**, 1043-1047 (1969).
- Obrenovitch,T.P. Update on the monitoring of changes in extracellular glutamate, and their significance. *NeuroReport* **9**, i-ii (1998).
- Ossowska,K., Wolfarth,S., Shulze,G., Wardas,J., Pietraszek,M., Lorenc-Koci,E., Smialowka,M. y Coper,H. Decline in motor functions in aging is related to the loss of NMDA receptors. *Brain Res.* **907**, 71-83 (2001).
- Owens,D.S, MacDonald,I., Tucker,P., Totterdell,P., Minors,D., Waterhouse,J. y Folkard,S. Diurnal variations in the mood and performance of highly practise young women living under strictly controlled conditions. *Br. J. Psychol.* **91**, 41-60 (2000).
- Palmer,A.M. y Dekosky,S.T. Monoamine neurons in aging and Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* **91**, 135-159 (1993).
- Pandi-Perumal,S.R., Seils,L.K., Kayumov,L., Ralph,M.R., Lowe,A., Moller,H. y Swaab,D.F. Senescence, sleep, and circadian rhythms. *Ageing Res. Rev.* **1**, 559-604 (2002).
- Paredes,D., Rada,P., Bonilla,E., Gonzalez,L.E., Parada,M. y Hernandez,L. Melatonin acts on the nucleus accumbens to increase acetylcholine release and modify the motor activity pattern of rats. *Brain Res.* **850**, 14-20 (1999).
- Parnavelas,J.G. Neurotransmitters in the cerebral cortex. En: The prefrontal cortex: its structure, function and pathology. Uylings,H.B.M., Van Eden,C.G., De Bruin,J.P.C., Corner,M.A. & Feenstra,M.G.P. (eds.), pp. 13-30. Elsevier, Amsterdam (1990).
- Pasinetti,G.M., Hassler,M., Stone,D. y Finch,C.E. Glial gene expression during aging in rat striatum and long-term responses to 6-OHDA lesions. *Synapse* **31**, 278-284 (1999).
- Patrickson,J.W. Anatomical basis for supraquiasmatic nucleus efferent input to nucleus accumbens and amygdala. Abstracts of Communications, 32nd Annual Meeting of the American Society for Neuroscience 177.14. 2002.
- Paulson,P.E. y Robinson,T.E. Relationship between circadian changes in spontaneous motor activity and dorsal versus ventral striatal dopamine neurotransmission assessed with on-line microdialysis. *Behav. Neurosci.* **108**, 624-635 (1994).
- Paulson,P.E. y Robinson,T.E. Regional differences in the effects of amphetamine withdrawal on dopamine dynamics in the striatum. *Neuropsychopharmacology* **14**, 325-337 (1996).
- Pei,Z. y Cheung,R.T.F. Melatonin protects SHSY5Y neuronal cells but not cultured astrocytes from ischemia due to oxygen and glucose deprivation. *J. Pineal Res.* **34**, 194-201 (2003).
- Peinado,J.M. y Mora,F. Glutamic acid as a putative transmitter of the interhemispheric corticocortical connections in the rat. *J. Neurochem.* **47**, 1598-1603 (1986).
- Peng,M.T., Jiang,M.J. y Hsu,H.K. Changes in running-wheel activit, eating and drinking and their day/night distributions throughout the life span of the rat. *J.Gerontol.* **35**, 339-347 (1980).

- Penit-Soria,J., Audinat,E. y Crepel,F. Excitation of rat prefrontal cortical neurons by dopamine: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res.* **425**, 263-274 (1987).
- Pepeu,G. y Giovannini,M.G. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learning and Memory* **11**, 21-27 (2004).
- Perry,E., Walker,M., Grace,J. y Perry,R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.* **22**, 273-280 (1999).
- Phillips,A.G., Ahn,S. y Floresco,S.B. Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predict accuracy of memory on delayed response task. *J. Neurosci.* **24**, 547-553 (2004).
- Pitrosky,B., Kirsch,R., Malan,A., Mocaer,E. y Pevet,P. Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am. J. Physiol.* **277**, R812-R828 (1999).
- Pocok,J.M., Cousin,M.A. y Nicholls,D.G. The calcium channel coupled to the exocytosis of L-glutamate from cerebellar granule cells is inhibited by thye spider toxin, Aga-GI. *Neuropharmacology.* **32**, 1185-1194 (1993).
- Poeggeler,B., Reiter,R.J., Tan,D.-X., Chen,L.D. y Manchester,L.C. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a Hypothesis. *J. Pineal Res.* **14**, 151-168 (1993).
- Ralph,M.R., Foster,R.G., Davis,F.C. y Menaker,M. Transplanted Suprachiasmatic Nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975-978 (1990).
- Redman,J., Armstrong,S. y Ng,K.T. Free-running activity rhythms in the rat:entrainment by melatonin. *Science* **219**, 1089-1091 (1983).
- Reep,R.L., Goodwin,G.S. y Corwin,J.V. Topographic organization in the corticocortical connections of medial agranular cortex in rats. *J. Comp. Neurol.* **294**, 262-280 (1990).
- Rehman,H.U. y Masson,E.A. Neuroendocrinology of ageing. *Age Aging* **30**, 279-287 (2001).
- Reiter, R.J. En: The brain as an endocrine organ. Cohen y Foley (eds.) pp.96-149 Springer-Verlag, New York (1989).
- Reiter,R.J. Neuroendocrine effects of light. *Int.J.Biometeorol.* **35**, 169-175. (1991).
- Reiter,R.J. The melatonin rhythm: both clock and calendar. *Experientia* **49**, 654-664 (1993).
- Robbins,T.W. From arousal to cognition: integrative position of the prefrontal cortex. *Prog. Brain Res.* **126**, 469-483 (2000).
- Roberts,E. y Frankel,S. Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* **187**, 55-63 (1950).
- Rodriguez-Moreno,A., López-García,J.C. y Lerma,J. Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *PNAS* **97**, 1293-1298 (2000).

- Rosenstein,R.E. y Cardinali,D.P. Central GABAergic mechanisms as targets for melatonin activity in brain. *Neurochem. Int.* **17**, 373-379 (1990).
- Rothstein,J.D., Dykes-Hoberg,M., Pardo,C.A., Bristol,L.A., Jin,L., Kund,R.W., Kanai,Y., Hediger,M.A., Wang,Y., Schielke,J.P. y Welty,D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-686 (1996).
- Rueter,L.E. y Jacobs,B.L. Changes in forebrain serotonin at the light-dark transition: correlation with behaviour. *NeuroReport* **7**, 1107-1111 (1996).
- Rusak,B. y Bina,K.G. Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu. Rev. Neurosci.* **13**, 387-401 (1990).
- Sanchez Andrés,J.V. Base moleculares y neurales de la memoria y el aprendizaje. En: Manual de neurociencias. Delgado,J.M., Ferrús,A., Mora,F. & Rubia,F. (eds.), pp. 855-874. Síntesis, Madrid (1998).
- Sano,A., Aoi,K., Azekawa,T., Sei,H. y Morita,Y. Diurnal monoamines variation in young and old rats: a microdialysis study. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. Tokyo Spec.No.*, 577-580 (1999).
- Sansvives,A. Ritmos y relojes biológicos: introducción a la cronobiología. Promociones y Publicaciones Universitarias. Barcelona (1989).
- Santiago,M., Machado,A. y Cano,J. Regulation of prefrontal cortical dopamine release by dopamine receptor agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **239**, 83-91 (1993).
- Sarter,M. y Bruno,J.P. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res. Rev.* **23**, 28-46 (1997).
- Sarter,M. y Bruno,J.P. Abnormal regulation of corticopetal cholinergic neurons and impaired information processing in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* **22**, 67-74 (1999).
- Satinoff,E. y Prosser,R.A. Suprachiasmatic nuclear lesions eliminate circadian rhythms of drinking and activity, but not of body temperature, in male rats. *Journal of Biological Rhythms* **3**, 1-22 (1988).
- Savaskan,E. Melatonin in aging and neurodegeneration. *Drug Development Research* **56**, 482-490 (2002).
- Schwartz,W.J. y Zimmerman,P. Lesions of the suprachiasmatic nucleus disrupt circadian locomotor rhythms in the mouse. *Physiol. Behav.* **49**, 1283-1287 (1990).
- Segovia,G., Porrás y Mora,F. Effects of 4-aminopyridine on extracellular concentrations of glutamate in striatum of the freely moving rat. *Neurochem. Res.* **22**, 1491-1497 (1997).
- Segovia,G. y Mora,F. Role of nitric oxide in modulating release of dopamine, glutamate and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res. Bull.* **45**, 275-279 (1998).
- Segovia,G., Del Arco,A. y Mora,F. Effects of aging on the interaction between glutamate, dopamine and GABA in striatum and nucleus accumbens of the awake rat. *J. Neurochem.* **73**, 2063-2072 (1999).

- Segovia,G., Porras,A., Del Arco,A. y Mora,F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1-29 (2001).
- Seiden,L.S., Sabol,K.E. y Ricaurte,G.A. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 639-677 (1993).
- Sharples,C.G. y Wonnacott,S. Neuronal nicotinic receptors. *Toxcris Reviews* **19**, 1-11 (2001).
- Shepherd,G.M. Biorhythms. En: *Neurobiology.*, pp. 507-527. Oxford University Press, New York (1988).
- Shieh,K.R., Chu,Y.S. y Pan,J.T. Circadian change of dopaminergic neuron activity: effects of constant light and melatonin. *NeuroReport* **8**, 2283-2287 (1997).
- Smith,A.D., Olson,R.J. y Justice,J.B., Jr. Quantitative microdialysis of dopamine in the striatum: effect of circadian variation. *J. Neurosci. Methods* **44**, 33-41 (1992).
- Somogyi,P., Tamás,G., Lujan,R. y Buhl,E.H. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* **26**, 113-135 (1998).
- Stanford,J.A., Hebert,M.A. y Gerhardt,G.A. Biochemical and anatomical changes in basal ganglia of aging animals. En *Functional neurobiology of aging*. Hof,P.R. y Mobbs,C.V. (eds.) pp.727-733. Academia Press, San Diego (2001).
- Stemmelin,J., Lazarus,C., Cassel,S., Kelche,C. y Cassel,J.-C. Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. *Neuroscience* **96**, 275-289 (2004).
- Stoessl,A.J., Martin-Iverson,M.T., Barth,T.M., Dourish,C.T. y Iversen,S.D. Effects of ageing on the behavioural responses to dopamine agonists: decreased yawning and locomotion, but increased stereotypy. *Brain Res.* **495**, 20-30 (1989).
- Swaab,D.F., Fliers,E. y Partiman,T.S. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain Res.* **342**, 37-44 (1985).
- Sylvester,C.M., Krout,K.E. y Loewy,A.D. Supraquiasmatic nucleus projection to the medial prefrontal cortex: a viral transneuronal tracing study. *Neuroscience* **114**, 1071-1080 (2002).
- Taylor,P. y Brown,J.H. Acetylcholine En: *Basic Neurochemistry*. Siegel,G.J., Agranoff,B.W., Albers,R.W., Fisher,S.K. y Uhler,M.D. (eds.) pp.213-242. Lippincott-Raven, New York (1999)
- Tellería,J.L. *Zoología evolutiva de los vertebrados.*, pp. 145-155 (Síntesis, Madrid,1987).
- Thierry,A.M., Godbout,R., Mantz,J. y Glowinski,J. Influence of the ascending monoaminergic system on the activity of the rat prefrontal cortex. En: *The prefrontal cortex: its structure, function and pathology*. Uylings,H.B.M., Van Eden,C.G., De Bruin,J.P.C., Corner,M.A. & Feenstra,M.G.P. (eds.), pp. 357-366. Elsevier, Amsterdam (1990).
- Timmerman,W. y Westerink,B.H.C. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* **27**, 242-261 (1997).

Tsai,T. y Chen,C. Simultaneous measurement of acetylcholine and monoamines by two serial on-line microdialysis systems: effects of methamphetamine on neurotransmitters release from the striatum of freely moving rats. *Neurosci. Lett.* **166**, 175-177 (1994).

Turek,F.W., Penev,P., Zhang,Y., Van Reeth,O. y Zee,P. Effects of age on the circadian system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **19**, 53-58 (1995).

Turek,F.W. y Kolker,D.E. Circadian rhythm and sleep in aging rodents. En: *Functional Neurobiology of Aging*. Hof,P.R. y Mobbs,C.V. (eds.) pp.869-882. Academia Press, San Diego (2001).

Turek,F.W., Scarbrough,K., Penv,P., Labyak,S., Valentinuzzi,V.S. y Van Reeth,O. Aging of the mammalian circadian system. En: *Handbook of behavioral neurobiology: circadian clocks*. Takahashi,J.S., Turek,F.W. & Moore R.Y. (eds.), pp. 291-317. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2001).

Tzschentke,T.M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog. Neurobiol.* **63**, 241-320 (2001).

Ungerstedt,U. Introduction to intracerebral microdialysis. En: *Microdilaysis in the Neurosciences*. Robinson,T.E. y Justice,J.B. (eds.), pp. 3-18. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam (1991).

Uylings,H.B.M. y Van Eden,C.G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and primates, including humans. En: *The prefrontal cortex: its structure, function and pathology*. Uylings,H.B.M., Van Eden,C.G., De Bruin,J.P.C., Corner,M.A. y Feenstra,M.G.P. (eds.), pp. 31-62. Elsevier, Amsterdam (1990).

van der Zee,E.A., Streefland,C., Strosberg,A.D., Schöder,H. y Luiten,P.G.M. Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinceptive neurons of the supraquiasmatic region in young and age rats. *Brain Res.* **542**, 348-352 (1991).

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

Vanecek,J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* **78**, 687-721 (1998).

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

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

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

Villares,J.C. y Stavale,J.N. Age-related changes in the N-methyl-D-aspartate receptor binding sites within the humen basal ganglia. *Exp. Neurol.* **171**, 391-404 (2004).

- Waagepetersen,H.S., Sonnewald,U. y Schousboe,A. The GABA paradox: Multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J. Neurochem.* **73**, 1335-1342 (1999).
- Wagner,S., Castel,M., Gainer,H. y Yarom,Y. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* **387**, 598-603 (1997).
- Weiler,M.H. Acetylcholine release from striatal slices of young adult and aged Fischer 344 rats. *Neurobiol. Aging* **11**, 401-407 (1990).
- Weiner,N. y Molinoff,P.B. Catecholamines. En: Basic neurochemistry. Siegel,G.J., Agranoff,B.W., Albers,R.W. y Molinoff,P.B. (eds.), pp. 261-281. Raven Press, New York (1994).
- West,R., Murphy,K.J., Armilio,M.L., Craik,F.Y.M. y Stuss,D.T. Effects of time of day on age differences in working memory. *J. Gerontol.* **57B**, P3-P10 (2002).
- Westerink,B.H.C. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav. Brain Res.* **70**, 103-124 (1995).
- Wirz-Justice,A. Circadian rhythm in mammalian neurotransmitter receptor. *Prog. Neurobiol.* **29**, 219-259 (1987).
- Wise,P.M., Cohen,I.R., Weiland,N.G. y London, D.E. Aging alters the circadian rhythm of glucose utilization in the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 5305-5309 (1988).
- Wright,K.P., Hull,J.T. y Czeisler,C.A. Relationship between alertness, performance and body temperature in humans. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol.* **283**, R1370-R1377 (2002).
- Yamazaki,S., Straume,M., Tei,H., Sakaki, Y., Menaker,M. y Block,G.D. Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 10801-10806 (2002).
- Yang,C.R., Seamans,J.K. y Gorelova,N. Developing a neuronal model for the pathophysiology of schizophrenia based on the nature of electrophysiological actions of dopamine in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* **21**, 161-194 (1999).
- Yoshimoto,K., Kato,B., Veda,S., Noritake,K., Saki,K., Shibata,M., Hori,M., Kawano,H. y Takechi,Y. Dopamine and serotonin uptake inhibitors on the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of young and aged rats. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1707-1721 (2001).
- You,Z.-B., Tzschentke,T.M., Brodin,E. y Wise,R.A. Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases cholecystokinin, glutamate, and dopamine release in the nucleus accumbens: an *in vivo* microdialysis study in freely moving rats. *J. Neurosci.* **18**, 6492-6500 (1998).
- Zisapel,N. Melatonin-dopamine interactions: from basic neurochemistry to clinical setting. *Cellular and Molecular Neurobiology* **21**, 605-615 (2001).

Zoli, M. y Agnati, L.F. Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses. *Prog. Neurobiol.* **49**, 363-380 (1996).