

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES Y  
ENVEJECIMIENTO CEREBRAL: ESTUDIO DE LA  
INTERACCIÓN GLUTAMATO-DOPAMINA-GABA EN EL  
ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA  
DESPIERTA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Gregorio Segovia Camargo

Bajo la dirección del doctor

Francisco Mora Teruel

**Madrid, 1999**

**ISBN: 84-669-2438-8**

T 23703

Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense  
MADRID



x-53-367044-5

INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES  
Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL:  
ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN GLUTAMATO-DOPAMINA-GABA  
EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS  
DE LA RATA DESPIERTA

Gregorio Segovia Camargo  
Madrid, Enero 1999

23703



BIBLIOTECA



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
Teléfono 394 14 39 - Fax 394 16 28  
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 "Interacción de neurotransmisores y envejecimiento cerebral: estudio de la interacción glutamato-dopamina-GABA en el estriado y núcleo accumbens de la rata despierta", que presenta D. GREGORIO SEGOVIA CAMARGO para optar al grado de Doctor ha sido realizada bajo su dirección.

Madrid, a 7 de Enero de 1999

Dr. Francisco Mora

## *Indice*

<b>INDICE</b> .....	<b>i</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ENVEJECIMIENTO CEREBRAL</b> .....	<b>1</b>
1.1 Cambios anatómicos .....	2
1.2 Cambios histológicos .....	2
1.3 Atrofia y muerte neuronal .....	3
1.4 Envejecimiento y células gliales .....	4
1.5 Cambios bioquímicos .....	4
1.6 Neurotransmisores y envejecimiento cerebral .....	5
<b>2. GLUTAMATO</b> .....	<b>6</b>
2.1 Neurotransmisión glutamatérgica .....	6
2.1.1 Metabolismo del glutamato .....	6
2.1.2 Almacenamiento, liberación e inactivación del glutamato .....	7
2.1.3 Receptores glutamatérgicos .....	7
2.1.4 Vías glutamatérgicas .....	10
2.2 Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica .....	11
2.2.1 Efectos del envejecimiento sobre la concentración de glutamato en muestras de tejido cerebral .....	11
2.2.2 Efectos del envejecimiento sobre la liberación de glutamato .....	12
2.2.3 Efectos del envejecimiento sobre los sistemas transportadores de glutamato .....	13
2.2.4 Efectos del envejecimiento sobre los receptores glutamatérgicos .....	13
<b>3. DOPAMINA</b> .....	<b>15</b>
3.1 Neurotransmisión dopaminérgica .....	15
3.1.1 Metabolismo de la dopamina .....	15
3.1.2 Almacenamiento, liberación e inactivación del dopamina .....	15
3.1.3 Receptores dopaminérgicos .....	16
3.1.4 Vías dopaminérgicas .....	18
3.2 Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica .....	18
3.2.1 Efectos del envejecimiento sobre la concentración de dopamina en muestras de tejido cerebral .....	18
3.2.2 Efectos del envejecimiento sobre la liberación de dopamina .....	19

## Indice

3.2.3 Efectos del envejecimiento sobre los sistemas transportadores de dopamina.....	19
3.2.4 Efectos del envejecimiento sobre los receptores dopaminérgicos .....	20
4. GABA .....	15
4.1 Neurotransmisión GABAérgica.....	21
4.1.1 Metabolismo de la GABA.....	21
4.1.2 Almacenamiento, liberación e inactivación del GABA.....	22
4.1.3 Receptores GABAérgicos.....	22
4.1.4 Vías GABAérgicas .....	23
4.2 Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión GABAérgica .....	25
4.2.1 Efectos del envejecimiento sobre la concentración de GABA en muestras de tejido cerebral.....	25
4.2.2 Efectos del envejecimiento sobre la liberación de GABA.....	26
4.2.3 Efectos del envejecimiento sobre los receptores GABAérgicos .....	26
5. RESUMEN Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	27
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
1. ANIMALES .....	30
2. MATERIAL .....	31
2.1 Construcción de implantes para la perfusión intracerebral <i>in vivo</i> .....	31
2.2 Construcción del sistema de cánulas de microdiálisis.....	32
2.3 Preparación de Equithesin.....	33
3. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	34
3.1 Procedimiento quirúrgico: estereotaxia.....	34
3.2 Perfusión intracerebral <i>in vivo</i> : microdiálisis.....	35
3.3 Análisis de neurotransmisores por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	37
3.3.1 Detección de aminoácidos por HPLC.....	37
3.3.2 Detección de catecolaminas por HPLC.....	41
3.4 Histología .....	44
4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	45

## *Indice*

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>1. EFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE PDC EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS JÓVENES.....</b>	<b>48</b>
1.1 Glutamato .....	48
1.2 Dopamina y metabolitos.....	51
1.3 GABA .....	59
1.4 Taurina .....	62
1.5 Glutamina .....	65
<b>2. EFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE CPP Y DNQX SOBRE LAS ACCIONES DEL PDC EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS JÓVENES.....</b>	<b>68</b>
2.1 Glutamato .....	68
2.2 Dopamina y metabolitos.....	71
2.3 GABA .....	79
2.4 Taurina .....	82
2.5 Glutamina .....	85
<b>3. EFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE PDC EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS DE EDAD MEDIA .....</b>	<b>88</b>
3.1 Glutamato .....	88
3.2 Dopamina y metabolitos.....	91
3.3 GABA .....	99
3.4 Taurina .....	102
3.5 Glutamina .....	105
<b>4. EFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE PDC EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS DE EDAD VIEJA Y MUY VIEJA.....</b>	<b>108</b>
4.1 Glutamato .....	108
4.2 Dopamina y metabolitos.....	111
4.3 GABA .....	119
4.4 Taurina .....	122
4.5 Glutamina .....	125
<b>5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE AMINOÁCIDOS Y CATECOLAMINAS EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA DESPIERTA.....</b>	<b>128</b>
4.1 Glutamato .....	128
4.2 GABA .....	128

## *Índice*

4.3 Taurina .....	128
4.4 Glutamina .....	128
4.5 Dopamina y metabolitos.....	128
<b>6. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LAS INTERACCIONES ENTRE AMINOÁCIDOS Y CATECOLAMINAS EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA DESPIERTA.....</b>	<b>135</b>
4.1 Glutamato .....	135
4.2 Dopamina y metabolitos.....	138
4.3 GABA .....	146
4.4 Taurina .....	149
4.5 Glutamina .....	152
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>155</b>
<b>1. ACERCA DEL USO DE LA MICRODIÁLISIS Y LOS BLOQUEANTES ESPECÍFICOS DEL TRANSPORTE PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES.....</b>	<b>155</b>
1.1 Microdiálisis e interacción de neurotransmisores.....	155
1.2 Estudios sobre el glutamato endógeno con la técnica de microdiálisis .....	157
1.3 PDC y concentración extracelular de glutamato: efecto del envejecimiento y de antagonistas de receptores glutamatérgicos .....	158
<b>2. ACERCA DE LA INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN EL ESTRIADO Y EL NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS JÓVENES .....</b>	<b>160</b>
2.1 Interacción glutamato/dopamina.....	160
2.2 Interacción glutamato/GABA.....	162
2.3 Interacción glutamato/taurina.....	163
2.4 Interacción glutamato/glutamina.....	164
<b>3. ACERCA DEL EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN EL ESTRIADO Y EL NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA DESPIERTA .....</b>	<b>167</b>
3.1 Envejecimiento y concentración extracelular basal de aminoácidos y catecolaminas .....	167
3.2 Envejecimiento e interacción de neurotransmisores.....	169
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>172</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>173</b>

### *Abreviaturas*

$\Delta$ [GLU]	variación de la concentración extracelular de glutamato
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
CPP	ácido 3-[(R)-2-carboxipiperazin-4-il]-propil-1-fosfónico
DA	dopamina
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	ácido glutámico decarboxilasa
GLN	glutamina
GLU	glutamato
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HVA	ácido homovalínico
mGluR	receptor glutamatérgico metabotrópico
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	o-ftaldialdehído
PDC	ácido L- <i>trans</i> -pirrolidin dicarboxílico
TAU	taurina



## *INTRODUCCIÓN*

## **1. ENVEJECIMIENTO CEREBRAL**

El envejecimiento humano y, por ende, los estudios experimentales en animales, ha cobrado en la última década un gran interés, sin duda debido al progresivo aumento de la edad media de las poblaciones en los países desarrollados. Esto último conlleva no sólo el deterioro de las capacidades motoras, sensoriales e intelectuales de los individuos sino también y, de modo sobresaliente, su mayor susceptibilidad a sufrir enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y las demencias tipo Alzheimer. De todo ello se desprende que el envejecimiento cerebral empieza a ser uno de los temas de investigación prioritarios en el mundo occidental.

El envejecimiento es un proceso deletéreo que acontece a todo ser vivo con el tiempo, y está caracterizado por una pérdida progresiva de las funciones propias de la madurez que culmina con la muerte del individuo. El envejecimiento es un proceso universal y normal, es decir, aunque conlleva una mayor susceptibilidad a sufrir enfermedades, el envejecimiento no es una acumulación de patologías. Este es, precisamente, uno de los principales factores que afectan a la interpretación de los resultados de los estudios sobre el envejecimiento: la dificultad de diferenciar entre los cambios primarios (debidos al envejecimiento *per se*) y los cambios que son consecuencia de patologías.

Una cuestión difícil de contestar es cuándo comienza la vejez. La "edad cronológica" es la única variable objetiva de que disponemos actualmente para definir la vejez. En el ser humano se suele considerar que el periodo de vejez comienza en torno a los 65 años. En el caso de la rata de raza Wistar (la que se usa en el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral), la mayoría de las publicaciones utilizan como animales viejos ratas de a partir de 18-20 meses de edad. Sin embargo, debe subrayarse que la edad de inicio del proceso de envejecimiento varía entre individuos de una misma especie, por lo que se han propuesto otras variables diferentes de la edad cronológica para definir la vejez, por ejemplo la «edad biológica» definida por el grado de funcionamiento del organismo. Sin embargo, definir la vejez de acuerdo al grado de funcionamiento no es posible mientras no dispongamos de parámetros para delimitar qué grado funcional es el característico de un individuo anciano.

Desde el punto de vista de la conducta, el envejecimiento se caracteriza por la pérdida de capacidad en funciones sensoriales, motoras y cognitivas (ver revisión en (Jolles, 1986; Katzman y Terry, 1992)). En relación con las funciones sensoriales y motoras, en los individuos viejos se han descrito deficiencias en tareas de percepción visual, auditiva y táctil, así como una disminución de la velocidad de realización de los movimientos simples (que parece relacionarse más con limitaciones musculares que con factores nerviosos) y un déficit de la coordinación de movimientos complejos (que se relaciona más con limitaciones neurológicas). Las alteraciones cognitivas más llamativas en los individuos ancianos son las que afectan a la memoria. Aunque en los humanos estas alteraciones son más intensas en las demencias, también están presentes en los individuos viejos sanos. Los déficits de memoria de los ancianos afectan, fundamentalmente, a la memoria a corto plazo así

## *Introducción*

como a la adquisición y consolidación de información nueva y a la evocación de esta información (memoria a largo plazo).

Los déficits funcionales que aparecen durante el envejecimiento son consecuencia de las modificaciones estructurales (anatómicas e histológicas) y bioquímicas que ocurren en el cerebro durante el proceso de envejecimiento. A continuación se describen brevemente estos cambios.

### **1.1 Cambios anatómicos**

Los cambios morfológicos descritos en el cerebro durante el proceso de envejecimiento incluyen disminuciones del peso y del volumen cerebral. Por ejemplo, en el humano, se ha descrito una disminución de en torno al 10% del peso del cerebro a los 90 años con respecto al individuo adulto (Brody, 1992; Katzman y Terry, 1992). De igual manera, la disminución del volumen cerebral se ha cuantificado en el humano en un 2% por década a partir de los 50 años, aunque esta disminución del volumen es diferente según la región cerebral estudiada. La disminución del peso y del volumen globales del cerebro en el humano durante el envejecimiento se acompaña de un aumento del tamaño de los surcos cerebrales, una disminución del tamaño de las circunvoluciones cerebrales y un aumento del volumen de los ventrículos (Brody, 1992; Katzman y Terry, 1992).

### **1.2 Cambios histológicos**

Los cambios microscópicos que ocurren en el cerebro durante el envejecimiento parecen ser el resultado de la degeneración de las neuronas. Tales cambios aparecen no sólo en individuos viejos sino también en el cerebro de individuos que padecen ciertas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer. Estos cambios incluyen la presencia de gránulos de lipofucsina, gránulos basófilos y ovillos neurofibrilares en el citoplasma de las neuronas y de placas seniles en el espacio extracelular (Katzman y Terry, 1992).

La presencia de gránulos de lipofucsina en el citoplasma de las células es expresión tanto de cambios degenerativos lentos como los que ocurren durante el envejecimiento, como también de lesiones crónicas. Se observan acúmulos de lipofucsina, por ejemplo, en células del corazón y del hígado como consecuencia del envejecimiento o en células de músculo estriado en extremidades paralizadas o inmovilizadas. La presencia de gránulos de lipofucsina en las neuronas es uno de los patrones más regulares del proceso de envejecimiento (Sohal y Wolfe, 1986; Dani, 1997). Por ejemplo, en la corteza cerebral de los humanos se ha descrito que el 10% de las grandes neuronas presentan cúmulos de lipofucsina (Brody, 1992). La lipofucsina procede principalmente de la interacción entre los productos de la peroxidación de los lípidos poliinsaturados de las membranas biológicas, provocada probablemente por radicales libres, con un variado grupo de moléculas biológicamente útiles (Dani, 1997). Aún no está claro si este pigmento es sólo

## *Introducción*

consecuencia de la acumulación de productos de desecho por degeneración o tras lesiones o puede producir daño celular por sí mismo.

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

Otro rasgo histológico común en el cerebro de individuos ancianos es la existencia de una maraña de fibrillas llamadas ovillos neurofibrilares así como la presencia en el espacio extracelular de placas neuríticas o placas seniles (Katzman y Terry, 1992; Dani, 1997). Ambas resultan ser la principal consecuencia de la precipitación de proteínas estructurales durante el envejecimiento neuronal (Dani, 1997). El núcleo de los ovillos neurofibrilares está formado por pares de filamentos helicoidales que contienen proteínas tau (proteínas asociadas a los microtúbulos) anormalmente fosforiladas. Las proteínas tau son componentes normales de las neuronas, por lo que se acepta que los ovillos neurofibrilares derivan de las proteínas del citoesqueleto neuronal tras un proceso de degeneración. Estos ovillos aparecen fundamentalmente en el citoplasma de neuronas de la corteza cerebral frontal y temporal y del hipocampo. En cuanto a las placas seniles, son formaciones aproximadamente esféricas, con un tamaño de entre 10 y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, que aparecen principalmente en la corteza cerebral y en el hipocampo. Están constituidas por un núcleo de sustancia amiloidea (el  $\beta$ -amiloide) rodeado por un anillo de fibrillas (prolongaciones neuronales degeneradas) y de células gliales. El  $\beta$ -amiloide está formado por un péptido (la proteína  $\beta$ -amiloide) que se sintetiza a partir de una proteína precursora (la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide). Tanto la proteína  $\beta$ -amiloide como su proteína precursora se sintetizan de forma normal en neuronas y células gliales, pero la proteína  $\beta$ -amiloide que forma parte de las placas seniles está alterada de forma que se hace insoluble y forma el núcleo en torno al cual aparece la placa senil.

### **1.3 Atrofia y muerte neuronal**

Además de los cambios histológicos descritos, durante el envejecimiento cerebral se produce atrofia y muerte de neuronas en ciertas regiones cerebrales (Coleman y Flood, 1987; Katzman y Terry, 1992; Dani, 1997; Haug, 1997). La atrofia neuronal descrita durante el envejecimiento consiste en una disminución progresiva del árbol dendrítico de las neuronas y de la densidad de espinas dendríticas y, como consecuencia, del número de sinapsis de estas neuronas (Katzman y Terry, 1992; Dani, 1997). Sin embargo, esta atrofia neuronal presenta una gran variabilidad dependiendo del área cerebral y de la fase del envejecimiento (Dani, 1997; Haug, 1997). Algunos estudios han demostrado incluso que durante el envejecimiento cerebral normal se puede producir un crecimiento dendrítico como respuesta a la pérdida de neuronas en determinadas áreas como la corteza cerebral y el hipocampo (Coleman y Flood, 1986). En relación con la variabilidad respecto al área

## *Introducción*

cerebral, varios estudios han mostrado que, aunque los fenómenos de degeneración y muerte neuronal parece que ocurren en toda la corteza cerebral, las regiones más afectadas parecen ser la prefrontal y la parieto-temporal (Coleman y Flood, 1987). También se produce pérdida de neuronas en el hipocampo, en la amígdala y en ciertas áreas subcorticales como el locus coeruleus, la sustancia negra, la substantia innominata (núcleo basal de Meynert) y varios núcleos hipotalámicos (p. ej. el núcleo supraquiasmático y el área preóptica medial) (Sabel y Stein, 1981; Coleman y Flood, 1987). Recientemente se ha sugerido sin embargo que el cambio principal que ocurre durante el envejecimiento es la atrofia de las neuronas pero no su pérdida (Haug, 1997).

### **1.4 Envejecimiento y células gliales**

Diferentes estudios han mostrado que el componente glial del cerebro aumenta con la edad tanto en ratas como en humanos (Brizzee et al., 1983; Terry, 1986; Nichols et al., 1995; David et al., 1997), describiéndose tanto un aumento relacionado con la edad de la proteína glial fibrilar (un marcador de los astrocitos) como del ARNm para esta proteína en varias estructuras cerebrales incluyendo el hipocampo y el estriado.

Basándose en estas observaciones, se ha sugerido que en el cerebro de individuos viejos existe una hiperactividad glial que puede tener consecuencias importantes en el metabolismo de varios neurotransmisores como el glutamato y el GABA (Cobo et al., 1992). Sin embargo, aún no está claro si esta hiperactividad glial es sólo una respuesta secundaria a la atrofia y muerte neuronal o si se puede asignar a la glía un papel primario en el envejecimiento cerebral.

### **1.5 Cambios bioquímicos**

A diferencia de las modificaciones histológicas, los cambios bioquímicos durante el envejecimiento cerebral no han sido tan extensamente estudiados y los resultados obtenidos son contradictorios. En todo caso, los cambios bioquímicos descritos parecen relacionarse con los cambios microscópicos ya mencionados.

En relación a los ácidos nucleicos, se ha descrito un aumento del contenido cerebral de ADN que podría deberse a la proliferación glial. El contenido de ARN parece disminuir con la edad en neuronas, pero se mantiene en células gliales (Marotta et al., 1986; Finch y Morgan, 1990). En lo que se refiere a las proteínas, se ha descrito una disminución del contenido de éstas en el cerebro durante el envejecimiento, cifrada en el 5-25% entre los 30 y 90 años en la especie humana. Esta disminución del contenido de proteínas en el cerebro podría ser consecuencia de alteraciones en su síntesis, tal y como sugiere la disminución paralela del contenido de ARN descrita en algunas neuronas (p. ej. en neuronas que contienen melatonina en sustancia negra y en neuronas piramidales de la corteza y del hipocampo) (Marotta et al., 1986; Finch y Morgan, 1990).

## **1.6 Neurotransmisores y envejecimiento cerebral**

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

Los estudios sobre las alteraciones que el envejecimiento puede producir en diferentes sistemas neurotransmisores son escasos. Probablemente, los neurotransmisores más estudiados en relación con el envejecimiento son la acetilcolina, la dopamina y la noradrenalina (ver revisión en (McGeer y McGeer, 1981; Carlsson, 1986; Pepeu, 1988; Katzman y Terry, 1992; Makman, 1993)). Las vías neurales más afectadas por el proceso de envejecimiento normal parecen ser las proyecciones que, desde el núcleo basal de Meynert, inervan la corteza cerebral (acetilcolina), las proyecciones que van desde el locus coeruleus a la corteza cerebral (noradrenalina) y las proyecciones que van desde la sustancia negra (pars compacta) al estriado (dopamina).

## **2. GLUTAMATO**

### **2.1. Neurotransmisión glutamatérgica**

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el sistema nervioso de los mamíferos. Tras la descripción en los años 50 de su actividad convulsiva y excitadora, multitud de estudios han establecido que el glutamato cumple el papel de neurotransmisor en la mayoría de las sinapsis excitadoras rápidas del cerebro (ver revisión en (Fagg y Foster, 1983; Fonnum, 1984; Cotman et al., 1987; Orrego y Villanueva, 1993; Nicholls, 1993).

#### 2.1.1. Metabolismo del glutamato

La síntesis de glutamato en el cerebro se puede realizar a través de multitud de rutas (a partir de glutamina,  $\alpha$ -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 cerebro ocurre, principalmente a partir de la glutamina por acción de la enzima glutaminasa (Bradford et al., 1978; Fonnum, 1993). También existe una ruta de síntesis a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato catalizada por la aspartato aminotransferasa (Young et al., 1988; McGeer y McGeer, 1989; Fonnum, 1993).

La glutaminasa es una enzima mitocondrial que se encuentra mayoritariamente en las terminaciones nerviosas de las neuronas glutamatérgicas, aunque se puede localizar en otros tipos celulares (Fonnum, 1993). La enzima glutaminasa está regulada principalmente mediante inhibición por su producto (Bradford et al., 1978); puede activarse por fosfato y  $\text{Ca}^{2+}$ , es decir, por el incremento de la actividad en la terminación nerviosa, y puede ser inhibida por  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{H}^+$  (Fonnum, 1993).

En cuanto al 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 la astrogliá (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979), si bien no se puede excluir una pequeña actividad de esta enzima en neuronas (Fonnum, 1993).

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

## Introducción

### 2.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación del glutamato

Una vez sintetizado, el glutamato es almacenado en vesículas sinápticas. El mecanismo de transporte vesicular de glutamato es igual al de dopamina: es independiente de  $\text{Na}^+$  y está acoplado a un gradiente de  $\text{H}^+$  que es generado por una  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa dirigida hacia el interior de la vesícula (Naito y Ueda, 1985; Nicholls, 1993). Al igual que la dopamina, existe además un almacén de glutamato en citoplasma.

La liberación sináptica  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente de glutamato tras estimulación química o eléctrica se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* (Fonnum, 1984; Paulsen y Fonnum, 1989; Nicholls, 1989; Sánchez-Prieto et al., 1994; Zilkha et al., 1995). Estudios en sinaptosomas han demostrado que esta liberación se produce por exocitosis y no por salida directa desde el citoplasma (Nicholls, 1989).

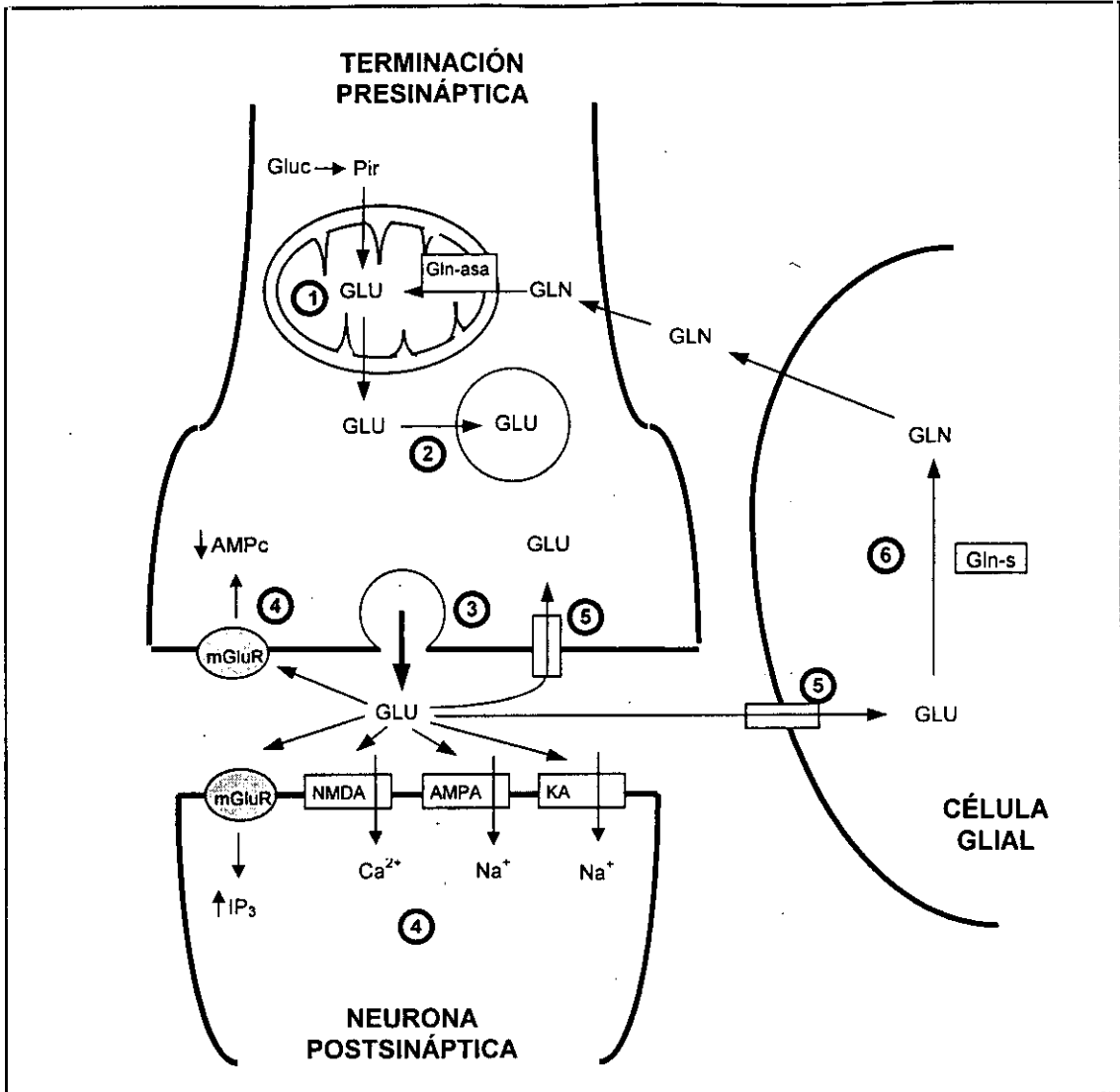
La inactivación del glutamato liberado al espacio sináptico se produce mediante la recaptura de éste en las terminales nerviosas y en los astrocitos circundantes a través de sistemas de captación de alta afinidad y dependientes del gradiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Nicholls, 1993; Gegelashvili y Schousboe, 1998). De estos dos componentes celulares, el glial es el que capta la mayoría del glutamato liberado (Rothstein et al., 1996; Gegelashvili y Schousboe, 1998): se ha calculado que, en el estriado, el 80% del glutamato es captado por los transportadores localizados en las células gliales (Rothstein et al., 1996). Se han clonado tres transportadores de membrana de alta afinidad para el glutamato (ver revisión en (Attwell y Mobbs, 1994)). Los tres parecen tener el mismo mecanismo de acción: la entrada de cada molécula de glutamato se acompaña de la entrada de 2 moléculas de  $\text{Na}^+$  y de la salida de 1 molécula de  $\text{K}^+$  y otra de  $\text{OH}^-$  o de  $\text{HCO}_3^-$ .

Algunos autores han sugerido que el transporte de glutamato puede invertirse, produciéndose una liberación de glutamato que es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este tipo de liberación, que puede ocurrir cuando la concentración extracelular de  $\text{K}^+$  es elevada o cuando se disipa el gradiente de  $\text{Na}^+$  (p. ej. con veratridina), se ha demostrado *in vitro* (Nicholls, 1989; Attwell et al., 1993). Actualmente se discute si la liberación de glutamato a través de su transportador pueda ser un componente importante de la liberación fisiológica de glutamato, o si sólo tiene lugar en determinadas condiciones patológicas (p. ej. en isquemia) (Nicholls y Attwell, 1990; Levi y Raiteri, 1993; Nicholls, 1993).

### 2.1.3. Receptores glutamatérgicos

Existen dos clases de receptores glutamatérgicos en el cerebro en función de sus características farmacológicas y moleculares: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Los receptores glutamatérgicos ionotrópicos son canales iónicos, mientras que los metabotrópicos están acoplados a proteínas G.





**Fig. 2:** Esquema de los procesos relacionados con la transmisión glutamatergica.

① Síntesis de glutamato (GLU) a partir de glutamina (GLN), reacción catalizada por la glutaminasa (Gln-asa). El glutamato también puede ser sintetizado a partir de glucosa (Gluc) (Pir: piruvato). ② Almacenamiento de glutamato en vesículas presinápticas. ③ Liberación de glutamato por exocitosis. ④ La unión del glutamato a los receptores AMPA y kainato (KA) produce la entrada de  $\text{Na}^+$  en la neurona postsináptica. La unión del glutamato a los receptores NMDA produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona postsináptica. La activación de los receptores metabotrópicos (mGluR) postsinápticos produce un aumento del inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). La activación de los mGlu-R presinápticos produce una disminución de AMPc. ⑤ Inactivación del glutamato recaptura a través de transportadores situados en las terminales presinápticas y en los astrocitos. ⑥ Síntesis de glutamina en glutamato a través de la acción de la glutamina sintetasa (Gln-s). La glutamina glial es liberada al espacio extracelular, captada por las terminales presinápticas y utilizada para sintetizar glutamato.

## Introducción

Farmacológicamente se han descrito tres tipos de receptores ionotrópicos para el glutamato en función de su diferente afinidad por sustancias: los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores  $\alpha$ - amino -3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propio-nato (AMPA), y los receptores kainato (Farooqui y Horrocks, 1991; Nakanishi, 1992; Sprengel y Seeburg, 1993). Recientemente se ha descrito la posible existencia de un cuarto tipo de receptores ionotrópicos, los receptores delta, basándose en estudios de clonación (Petralia y Wenthold, 1996).

El receptor NMDA es un canal iónico selectivo para el  $\text{Ca}^{2+}$  regulado por múltiples sitios de unión. Se han descrito sitios de unión específicos para el glutamato o sus agonistas; para glicina; para cationes, en el interior del canal, donde el  $\text{Mg}^{2+}$  puede unirse y bloquear el flujo de iones; para penciclidinas; para poliaminas; para el  $\text{Zn}^{2+}$  (distinto del de  $\text{Mg}^{2+}$ ); para  $\text{H}^+$  y un sitio redox (Farooqui y Horrocks, 1991; Nakanishi, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994). Los receptores NMDA poseen una elevada permeabilidad para el  $\text{Ca}^{2+}$ , pueden activarse de forma prolongada y pueden ser bloqueados por  $\text{Mg}^{2+}$  dependiendo del voltaje de la membrana (Nakanishi, 1992; Sprengel y Seeburg, 1993). 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.

Los receptores AMPA son canales iónicos independientes de voltaje, de cinética rápida y con permeabilidad selectiva para cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). 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 cerebro sea muy similar a la del receptor NMDA: ambos se encuentran en alta concentración en la corteza cerebral, el hipocampo, el estriado y el tálamo (Farooqui y Horrocks, 1991; Sprengel y Seeburg, 1993).

Los receptores kainato presentan, como los receptores AMPA, una alta permeabilidad para cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) (Farooqui y Horrocks, 1991; Sprengel y Seeburg, 1993). En realidad, varios estudios han mostrado que el kainato puede actuar tanto sobre receptores kainato como sobre receptores AMPA. El papel fisiológico de estos receptores KA es incierto, aunque se ha sugerido su participación en la transmisión excitadora rápida. Recientemente se ha descrito una acción inhibitoria de la liberación presináptica de GABA en el hipocampo (Rodríguez-Moreno et al., 1997). Su localización es complementaria a la de los receptores NMDA y AMPA, si bien parecen estar presentes en todos los circuitos neuronales del Sistema Nervioso Central (Nakanishi, 1992; Sprengel y Seeburg, 1993).

Los receptores metabotrópicos, por su parte, actúan acoplados a distintos efectores celulares a través de proteínas G. Se han clonado hasta 8 tipos diferentes de estos receptores (mGluR1-8), que se han agrupado en tres familias en función de la afinidad por diferentes agonistas y de los segundos mensajeros ligados a su

## *Introducción*

activación (Nakanishi, 1992; Schoepp y Conn, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994; Pin y Duvoisin, 1995):

- Los receptores mGluR1 y 5 responden mejor al quisqualato y su estimulación aumenta la síntesis de inosítoles trifosfato y, por tanto, la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  por movilización de las reservas internas de este catión; se ha descrito también el aumento de los niveles de AMPc y de ácido araquidónico por activación del receptor mGluR1.

- Los receptores mGluR2 y 3 responden mejor al trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato y su estimulación inhibe la formación de AMPc.

- Los receptores mGluR4, 6 y 7 responden mejor al 2-amino-4-fosfonobutirato y su estimulación también inhibe la síntesis de AMPc.

En cuanto a los receptores mGluR8 son de difícil clasificación: algunos autores los incluyen dentro del grupo de los receptores mGluR2-3 (Nakanishi, 1992) y otros dentro del grupo de los receptores mGluR4-6-7 (Pin y Duvoisin, 1995).

Se ha asignado a los receptores metabotrópicos un papel predominantemente modulador de la neurotransmisión (Nakanishi, 1992; Baskys, 1992). Aunque la activación de estos receptores puede producir despolarización (Schoepp y Conn, 1993), sus efectos pueden ser tanto excitadores como inhibidores en función de los distintos efectores celulares a los que estén acoplados. De hecho se ha descrito un aumento de las corrientes de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{K}^+$  tras activación de receptores metabotrópicos que provoca una reducción de la excitabilidad neuronal (Schoepp y Conn, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994).

La activación de receptores metabotrópicos presinápticos puede controlar la liberación de glutamato. Por un lado, autorreceptores presinápticos del tipo mGluR4 (que fueron considerados hace años como un tipo diferente de receptores glutamatérgicos: los receptores 2-amino-4-fosfonobutirato -AP4-), pero también de los tipos mGluR2 y mGluR3, pueden inhibir la liberación de glutamato (Nakanishi, 1992; Schoepp y Conn, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994). Sin embargo, se ha descrito también un efecto presináptico facilitador de la liberación de glutamato tras activación de receptores metabotrópicos, si bien se desconoce el subtipo de receptor implicado (Sánchez-Prieto et al., 1996).

### 2.1.4. Vías glutamatérgicas

Las neuronas glutamatérgicas están distribuidas ampliamente en todo el cerebro, principalmente en el telencéfalo, donde la mayoría de las proyecciones corticales contienen glutamato (ver revisión en (Fagg y Foster, 1983; 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

## *Introducción*

integración sensorial, mientras que las que usan receptores AMPA o kainato lo están a la transmisión excitadora rápida (Cotman et al., 1987).

Las vías glutamatérgicas mejor conocidas son las proyecciones córtico-fugales que, desde corteza, llegan a estriado, tálamo y núcleos del tronco cerebral (Cotman et al., 1987). También han sido descritas vías glutamatérgicas tálamo-corticales y córtico-corticales, éstas últimas fundamentalmente en el hipocampo. Son glutamatérgicas, por ejemplo, la vía entorrino-cortical (vía perforante), las fibras comisurales, las fibras musgosas y las colaterales de Schaffer (Fagg y Foster, 1983; Fonnum, 1984; Cotman et al., 1987).

### **2.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica**

Dada la abundancia de glutamato en la corteza cerebral y la importancia de las vías cortico-fugales, la mayoría de estudios acerca de los efectos del envejecimiento en la neurotransmisión glutamatérgica se han centrado en éste área y sus proyecciones, especialmente, la vía corticoestriatal (ver revisión en (Porras et al., 1999)). Se han descrito reducciones consistentes de la concentración de glutamato en muestras de tejido cortical, pero este dato no nos informa sobre el estado de la neurotransmisión glutamatérgica dada la participación del glutamato en multitud de rutas metabólicas. También se ha descrito una estabilidad en la liberación presináptica de glutamato tanto basal como estimulada. Sin embargo, El cambio mejor establecido es la reducción en la densidad de receptores del tipo NMDA en todas las áreas cerebrales estudiadas. De forma más controvertida se han descrito también reducciones en la capacidad de transporte de glutamato (Tabla 2).

#### 2.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de glutamato en muestras de tejido cerebral

Diferentes estudios han mostrado un menor contenido de glutamato en la corteza cerebral de animales viejos en comparación con animales jóvenes (Davis y Himwich, 1975; Strolin Benedetti et al., 1990; Strolin Benedetti et al., 1991; Saransaari y Oja, 1995). Sin embargo, la corteza es una estructura heterogénea y los cambios relacionados con la edad pueden ocurrir de forma diferencial. De hecho, en estudios analizando las diferentes áreas corticales se describe cantidades menores de glutamato en la corteza frontal de animales viejos (Fornieles et al., 1986; Dawson, Jr. et al., 1989; Wallace y Dawson, Jr., 1990) pero no en las cortezas parietal o temporal (Fornieles et al., 1986; Banay-Schwartz et al., 1989a). Incluso dentro de la corteza frontal se ha descrito una disminución de glutamato con la edad en la corteza prefrontal medial pero no en las subdivisiones sulcal y dorsal de la corteza prefrontal (Fornieles et al., 1986). En el hipocampo, también parece existir una concentración de glutamato menor en animales viejos en comparación con animales jóvenes (Banay-Schwartz et al., 1989a; Strolin Benedetti et al., 1990; Strolin Benedetti et al., 1991; Saransaari y Oja, 1995). Las disminuciones de la concentración de glutamato en la corteza cerebral, específicamente en la corteza frontal, y en el hipocampo durante el envejecimiento concuerdan con la pérdida de

## Introducción

neuronas descrita en la corteza cerebral (Coleman y Flood, 1987). En estas estructuras, la mayoría de las neuronas son glutamatérgicas, por lo que la disminución de la concentración de glutamato puede ser consecuencia de la muerte neuronal que ocurre durante el envejecimiento.

En el estriado y el núcleo accumbens, los resultados descritos en la bibliografía son contradictorios, habiéndose descrito disminuciones (Strolin Benedetti et al., 1990; Strolin Benedetti et al., 1991), ausencia de cambios (Dawson, Jr. et al., 1989; Wallace y Dawson, Jr., 1990; Donzanti y Ung, 1990; Saransaari y Oja, 1995) e incluso aumentos (Donzanti y Ung, 1990) de la concentración de glutamato durante el envejecimiento. En otras estructuras cerebrales, los resultados obtenidos son también contradictorios. Por ejemplo, en la sustancia negra se han descrito aumentos (Donzanti y Ung, 1990), ausencia de cambios (Banay-Schwartz et al., 1989b) y disminuciones (Strolin Benedetti et al., 1990; Strolin Benedetti et al., 1991) del contenido de glutamato.

### 2.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la liberación de glutamato

En la corteza cerebral, la mayoría de los estudios han demostrado que no existen cambios a lo largo de la edad en la liberación de glutamato en condiciones basales. Esta ausencia de cambios durante el envejecimiento se ha descrito tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in vivo* (Dawson, Jr. et al., 1989; Dawson y Wallace, 1992; Cobo et al., 1992; Palmer et al., 1994; Saransaari y Oja, 1994; Sánchez-Prieto et al., 1994; Saransaari y Oja, 1995). En cuanto a la liberación de glutamato en corteza inducida por agentes despolarizantes tales como  $K^+$  o 4-aminopiridina, tampoco parece cambiar durante el envejecimiento (Dawson, Jr. et al., 1989; Palmer et al., 1994; Saransaari y Oja, 1994; Sánchez-Prieto et al., 1994). Sin embargo, cuando se han analizado áreas determinadas de la corteza se han encontrado algunos cambios. Por ejemplo, en la corteza temporal se ha descrito una liberación de glutamato inducida por  $K^+$  mayor en animales viejos que en animales jóvenes (Meldrum et al., 1992). En la corteza prefrontal se ha descrito además una disminución de la sensibilidad al estímulo eléctrico en animales viejos (Cobo et al., 1992).

En el estriado, la mayoría de los estudios muestran que la concentración de glutamato en condiciones basales (Sánchez-Prieto et al., 1994; Porrás y Mora, 1995; Saransaari y Oja, 1995) o tras estimulación (Freeman y Gibson, 1987; Donzanti et al., 1993; Sánchez-Prieto et al., 1994; Saransaari y Oja, 1995; Corsi et al., 1997) no cambia durante el envejecimiento. Sin embargo, se han descrito también tanto aumentos como disminuciones con la edad en la concentración basal de glutamato (Freeman y Gibson, 1987; Massieu y Tapia, 1997; Corsi et al., 1997). Es posible que las diferencias en estos resultados se deban a que los cambios causados por el envejecimiento se produzcan en ciertas regiones del estriado pero no en otras. En este sentido, se ha descrito un aumento de la concentración basal de glutamato durante el envejecimiento en el estriado lateral pero no en el estriado medial de la rata (Donzanti et al., 1993).

## *Introducción*

En otras áreas cerebrales también se ha estudiado la liberación de glutamato con el envejecimiento, obteniéndose resultados contradictorios. Por ejemplo, en el hipocampo se ha descrito una concentración extracelular de glutamato en condiciones basales mayor en animales viejos que en animales jóvenes (utilizando ratones y ratas) (Freeman y Gibson, 1987; Meldrum et al., 1992), aunque Saransaari y Oja (1995) describen una menor concentración de glutamato en ratones viejos. También son controvertidos los resultados obtenidos cuando se induce la liberación de glutamato por  $K^+$ : algunos autores muestran que es mayor en animales viejos (Meldrum et al., 1992; Saransaari y Oja, 1995), pero otros autores no detectan tales cambios (Freeman y Gibson, 1987).

### 2.2.3. Efectos del envejecimiento sobre los sistemas transportadores de glutamato

Los trabajos que estudian la capacidad de recaptar glutamato por parte de las neuronas y las células gliales en relación con el proceso de envejecimiento ofrecen resultados contradictorios. En la corteza cerebral y en el estriado se han descrito tanto disminuciones (Price et al., 1981; Wheeler y Ondo, 1986; Najlerahim et al., 1990; Saransaari y Oja, 1995) como aumentos (Strong et al., 1984) o ausencia de cambios (Dawson, Jr. et al., 1989; Palmer et al., 1994) de la capacidad de recaptación de glutamato durante el envejecimiento. Las diferencias entre estos resultados podrían deberse a la existencia de un aumento de la afinidad de los transportadores que compensaría la reducción en el número de transportadores, tal y como se ha sugerido recientemente (Price et al., 1981; Saransaari y Oja, 1995).

Por otra parte, estos estudios están hechos utilizando métodos *in vitro*, sobre todo preparaciones de sinaptosomas (terminales nerviosas), que no incluyen células gliales. Sin embargo, el glutamato liberado al espacio sináptico es captado fundamentalmente por las células gliales (Rothstein et al., 1996; Gegelashvili y Schousboe, 1998), por lo que reducciones en transporte neuronal de glutamato podrían ser compensados por cambios en sentido contrario en el componente glial, por ejemplo con el aumento del número o de la capacidad funcional de los astrocitos (Brizzee et al., 1983; Terry, 1986; David et al., 1997). Esta posibilidad se ve apoyada por los resultados obtenidos utilizando cortes de tejido cerebral, que incluyen tanto neuronas como células gliales, y que han descrito el mantenimiento de la capacidad de recaptación de glutamato durante el envejecimiento (Dawson, Jr. et al., 1989).

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

### 2.2.4. Efectos del envejecimiento sobre los receptores glutamatérgicos

El cambio mejor establecido en relación con el estado de la neurotransmisión glutamatérgica durante el envejecimiento es la disminución de receptores glutamatérgicos del tipo NMDA. Esta disminución se ha descrito en la mayoría de las

## Introducción

áreas corticales, en el hipocampo y en el estriado (Peterson y Cotman, 1989; Tamaru et al., 1991; Wenk et al., 1991; Cohen y Müller, 1992; Magnusson y Cotman, 1993; Cimino et al., 1993; Serra et al., 1994; Castorina et al., 1994; Wardas et al., 1997). Junto a la disminución de la densidad de receptores NMDA se han descrito otros cambios en este receptor durante el envejecimiento. Por ejemplo, se ha descrito una disminución de la respuesta postsináptica tras la estimulación del receptor NMDA (Baskys et al., 1990; Gonzales et al., 1991; Cepeda et al., 1996), aunque también un aumento de la afinidad del receptor NMDA por el glutamato (Cohen y Müller, 1992). Así mismo, se han descrito cambios en la influencia que tienen los sitios de modulación del receptor NMDA sobre la actividad de este receptor (Miyoshi et al., 1990; Piggott et al., 1992).

El número de receptores glutamatérgicos AMPA parece experimentar también disminuciones con el envejecimiento, sin embargo, los resultados con este receptor no son tan consistentes como los obtenidos con el receptor NMDA. Así, se han descrito disminuciones en el número de receptores AMPA en la corteza frontal y parietal del ratón (Magnusson y Cotman, 1993), pero no en la corteza cerebral de la rata (Tamaru et al., 1991; Cimino et al., 1993). Por otra parte, en el hipocampo se han descrito disminuciones del número de receptores AMPA durante el envejecimiento en algunas áreas, pero no en todo el hipocampo (Magnusson y Cotman, 1993; Cimino et al., 1993). Se ha descrito también una disminución de la respuesta a la estimulación de estos receptores en el hipocampo (Barnes, 1994).

En relación con el receptor kainato, en nuestro conocimiento sólo existe un trabajo que lo estudie en relación con el envejecimiento, señalando que no varía con la edad en corteza e hipocampo (Tamaru et al., 1991). No existen trabajos publicados que estudien otros receptores glutamatérgicos durante el envejecimiento. Por otra parte, algunos trabajos han descrito que la respuesta neuronal tras la aplicación exógena de glutamato no cambia con la edad en corteza y en hipocampo (Lippa et al., 1981; Rao et al., 1993; Abdulla et al., 1995), pero disminuye en el estriado (Cepeda et al., 1996).

---

**Tabla 2:** Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión glutamatérgica en la corteza cerebral y el estriado de la rata

---

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

### **3. DOPAMINA**

#### **3.1 Neurotransmisión dopaminérgica**

Considerada inicialmente como intermediario de la síntesis de noradrenalina, la investigación acerca de la dopamina aumentó rápidamente tras su identificación como neurotransmisor en los años 60, debido, en parte, al descubrimiento de su implicación en la enfermedad de Parkinson y en la esquizofrenia (ver revisión en (Côté y Crutcher, 1991; Cooper et al., 1996; Côté y Crutcher, 1991)).

##### **3.1.1 Metabolismo de la dopamina**

La síntesis de dopamina se realiza en el citosol de las neuronas a partir de la tirosina mediante la acción de las enzimas tirosina-hidroxilasa y dopa-decarboxilasa. La enzima limitante en esta ruta de síntesis es la tirosina-hidroxilasa. Esta enzima se encuentra en el citosol de las neuronas catecolaminérgicas, requiere de la presencia de  $O_2$ ,  $Fe^{2+}$  y el cofactor tetra-hidrobiopterina y es inhibida por su producto (Weiner y Molinoff, 1994; Cooper et al., 1996).

En cuanto a la degradación de la dopamina, ésta se lleva a cabo por medio de la acción de dos enzimas: la monoaminoxidasa y la catecol-O-metil-transferasa. La monoaminoxidasa es una enzima intracelular que se encuentra localizada en la cara externa de las mitocondrias y degrada la dopamina citoplasmática que no está almacenada dentro de las vesículas presinápticas. La catecol-O-metiltransferasa es una enzima principalmente extracelular que, en el cerebro, y degrada la DA liberada a la hendidura sináptica (Weiner y Molinoff, 1994; Cooper et al., 1996).

##### **3.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación de la dopamina**

Una vez sintetizada, la dopamina es introducida en las vesículas presinápticas a través de sistemas de transporte acoplados a un gradiente de  $H^+$  que es mantenido por una ATPasa dependiente de  $Mg^{2+}$  (Seiden et al., 1993). Sin embargo, no toda la dopamina neuronal se encuentra dentro de las vesículas: existe una pequeña proporción de dopamina libre en el citosol. La dopamina vesicular es liberada de forma dependiente de  $Ca^{2+}$  tras una despolarización de la membrana neuronal. La dopamina que se encuentra en el citoplasma puede ser liberada de forma independiente de  $Ca^{2+}$  mediante la inversión del sentido del transporte de dopamina a través de los sistemas transportadores que se encuentran en la membrana de la terminación nerviosa, aunque esta liberación independiente de  $Ca^{2+}$  no parece ser fisiológica (Levi y Raiteri, 1993; Seiden et al., 1993).

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



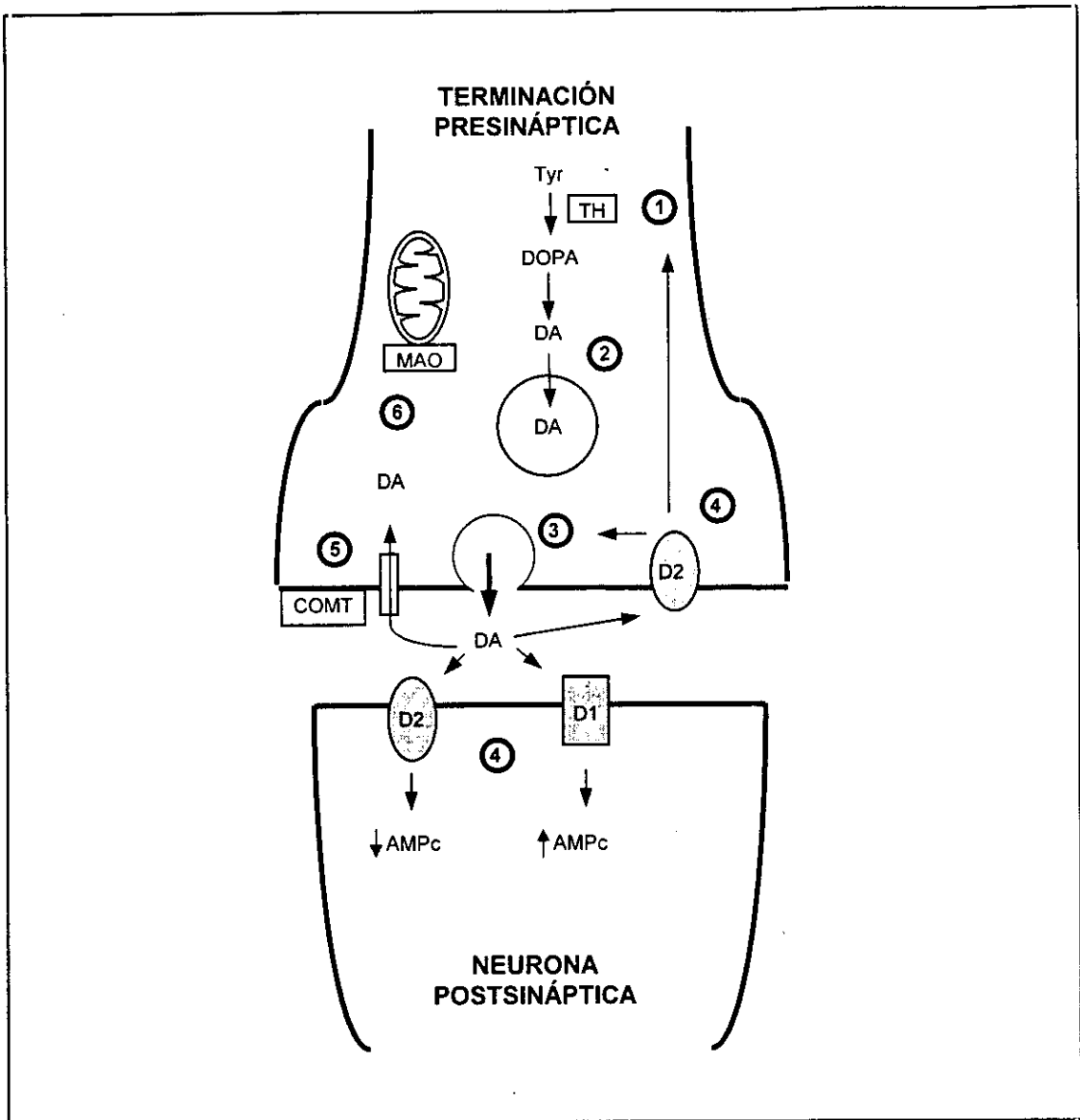
### 3.1.3. Receptores dopaminérgicos

Los receptores dopaminérgicos se han descrito clásicamente, y basándose en estudios farmacológicos, en dos tipos: los receptores D1 y los receptores D2, ambos acoplados a proteínas G. La activación de los receptores D1 estimula la adenilato-ciclase y eleva, por tanto, la concentración de AMPc. La activación de los receptores D2, en general, inhibe la adenilato-ciclase, aunque también pueden actuar a través de la apertura de canales de K<sup>+</sup>, el bloqueo de canales de Ca<sup>2+</sup> y la inhibición de la ruta de los fosfatidil-inositoles (Sibley y Monsma, 1992; Cooper et al., 1996).

Los estudios moleculares han mostrado la existencia de un mayor número de receptores dopaminérgicos (Sibley y Monsma, 1992; Weiner y Molinoff, 1994). Hasta la fecha se han descrito seis tipos de receptores dopaminérgicos: D1, D2s, D2l, D3, D4 y D5. A pesar de todo, estos receptores se pueden seguir clasificando en base a los tipos farmacológicos clásicos. Así, los receptores D1 y D5 estimulan la adenilato-ciclase y forman la familia de receptores D1 (se los denomina a veces como D1A y D1B respectivamente). Por otra parte, los receptores D2s, D2l, D3 y D4 inhiben la adenilato-ciclase y forman la familia de receptores D2 (denominados a veces como D2As, D2Al, D2B y D2C respectivamente).

Farmacológicamente, los receptores D1 y D5 son equivalentes (el SKF-38393 y el fenoldopam actúan como agonistas selectivos en ambos y el SKF-83566 y el SCH-23390 actúan sobre ellos como antagonistas selectivos). La única diferencia conocida actualmente entre ambos tipos de receptores es su localización: ambos son postsinápticos, pero los D1 se localizan en el estriado, el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio mientras que los D5 se encuentran en el hipocampo y el hipotálamo (Sibley y Monsma, 1992; Cooper et al., 1996).

En cuanto a la familia de receptores D2, el N-0437 y la bromocriptina actúan como agonistas selectivos en todos ellos; sin embargo, el sulpiride y el YMO-91512 son antagonistas selectivos de los receptores D2 y D3, mientras que la clozapina actúa como antagonista selectivo de los receptores D4. Por otra parte, los D2 se encuentran, fundamentalmente, en el estriado, el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio, los D3 en el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio y el cerebelo, y los D4 en la corteza frontal, la médula espinal y el mesencéfalo (Sibley y Monsma, 1992; Cooper et al., 1996). En general, los receptores D2 se pueden localizar a nivel tanto pre como post-sináptico. Los receptores D2 presinápticos (autorreceptores) se encuentran en terminaciones nerviosas, fundamentalmente en las terminaciones dopaminérgicas, y no parecen estar acoplados a proteínas G. Estos receptores presinápticos regulan la síntesis y liberación de dopamina (ver revisión en (Roth, 1984)). Los receptores D2 postsinápticos sí están acoplados a la adenilato-ciclase a través de proteínas G de forma que su activación inhibe la adenilato-ciclase.



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

### 3.1.4. Vías dopaminérgicas

Las principales vías dopaminérgicas del cerebro de la rata son las que forman los sistemas de proyección mesoestriatal, mesolímbico y mesocortical. Se originan en la sustancia negra y el área ventrotegmental del mesencéfalo y proyectan a estriado, áreas límbicas y áreas de la corteza cerebral respectivamente (Björklund y Lindvall, 1984; Cooper et al., 1996).

Se han descrito otras vías dopaminérgicas que van desde hipotálamo dorsal y posterior hacia médula espinal; desde zona incierta e hipotálamo periventricular a área preóptica e hipotálamo periventricular; desde sustancia gris periacueductal y sustancia gris periventricular del hipotálamo a sustancia gris periacueductal, tálamo medial e hipotálamo medial; y desde núcleos arcuato y periventricular a pituitaria y eminencia media. Además de estas neuronas de proyección, existen interneuronas dopaminérgicas en bulbo olfatorio y retina (Björklund y Lindvall, 1984; Cooper et al., 1996).

## **3.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica**

Probablemente, la vía mejor estudiada en relación con el envejecimiento cerebral es la proyección dopaminérgica nigro-estriatal (ver revisión en (Joseph et al., 1990)). Esto se debe, en gran parte, al descubrimiento de que la enfermedad de Parkinson se produce como consecuencia de la muerte de las neuronas de proyección de la sustancia negra, con la consiguiente disminución del contenido de dopamina en el estriado (ver revisión en (Lozano et al., 1998)). Los resultados descritos en la bibliografía sugieren que el envejecimiento produce una alteración de la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado fundamentalmente a nivel postsináptico, produciendo una disminución del número de receptores de dopamina (Tabla 1). A nivel presináptico, la disminución del número de neuronas descrita en la sustancia negra parece tener como consecuencia una disminución de los sitios de recaptura de dopamina y, aunque de forma más controvertida, de la capacidad de liberar dopamina por parte de las terminales dopaminérgicas (Tabla 1). Se ha sugerido que estas alteraciones de la neurotransmisión dopaminérgica estarían implicadas en las alteraciones motoras y cognitivas que se observan en los individuos viejos (Murray y Waddington, 1991; Arnsten, 1993).

### 3.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de dopamina en muestras de tejido cerebral

Los sistemas dopaminérgicos son, posiblemente, los más afectados durante el envejecimiento (ver revisión en (Joseph et al., 1990; Makman, 1993)). Un buen indicador del estado en que se encuentran los procesos de síntesis y degradación de la dopamina es la concentración de dopamina en tejido, que nos informa, por tanto, de la cantidad de dopamina de que disponen las terminales dopaminérgicas. Esta aproximación metodológica ha sido muy utilizada para estudiar el efecto del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica. Los resultados descritos

## Introducción

son, sin embargo, contradictorios: diferentes autores han descrito en la rata una disminución del contenido de dopamina en el estriado durante el envejecimiento (Ponzio et al., 1982; Strong et al., 1984; Giorgi et al., 1987; Stoessi et al., 1989; Marshall y Rosenstein, 1990); sin embargo, otros no han detectado tales cambios (Rose et al., 1986; Watanabe, 1987; Godefroy et al., 1989).

Por otra parte, se ha descrito una disminución con la edad de la actividad de la enzima tirosina-hidroxilasa en el estriado de la rata durante el envejecimiento (Ponzio et al., 1982) y una reducción similar de la tasa de síntesis de dopamina (Watanabe, 1987; Marshall y Rosenstein, 1990). Estos datos sugieren que existe una disminución real de dopamina en el estriado durante el envejecimiento. Además, esta hipótesis se ve apoyada por la disminución del número de neuronas durante el envejecimiento descrita en la sustancia negra (donde se encuentran los cuerpos celulares de la terminaciones dopaminérgicas del estriado) (Sabel y Stein, 1981; Felten et al., 1992). En un reciente estudio se ha mostrado, sin embargo, que cuando se estudia la actividad de la enzima tirosina-hidroxilasa en función del número de células dopaminérgicas restantes, existe un aumento de la síntesis de dopamina que actuaría como mecanismo compensatorio (Greenwood et al., 1991).

### 3.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la liberación de dopamina

Hay pocos trabajos que hayan estudiado las concentraciones cerebrales de dopamina en condiciones basales. En el estriado, varios trabajos, utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*, no han detectado cambios significativos de las concentraciones extracelulares de dopamina con la edad (Gregerson y Selmanoff, 1990; Diuzen et al., 1991; Santiago et al., 1993; Kametani et al., 1995).

Por otro lado, se ha investigado también la liberación de dopamina inducida por altas concentraciones de  $K^+$ , como modelo para estudiar la capacidad de las terminaciones dopaminérgicas para liberar dopamina. Durante el envejecimiento, se ha descrito que la liberación *in vitro* (Thompson et al., 1981; Joseph et al., 1988; Woodward et al., 1989) e *in vivo* (Santiago et al., 1993; Kametani et al., 1995) de dopamina inducida por  $K^+$  se mantiene sin cambios en el estriado de animales viejos. Sin embargo, otros autores han descrito disminuciones con la edad de la liberación de dopamina inducida por  $K^+$  (Rose et al., 1986; Diuzen et al., 1991; Friedemann y Gerhardt, 1992; Dobrev et al., 1995).

### 3.2.3. Efectos del envejecimiento sobre los sistemas transportadores de dopamina

Uno de los métodos utilizados para estudiar la capacidad de liberar dopamina de las terminaciones dopaminérgicas ha sido la aplicación de anfetamina. Sin embargo, la anfetamina produce una liberación de dopamina citoplasmática que es independiente de  $Ca^{2+}$ , por lo que estos estudios nos informan más del estado de los sistemas de transporte y de la capacidad de síntesis de dopamina que de los mecanismos de liberación vesicular. En el estriado y en el núcleo accumbens, varios trabajos *in vivo* han descrito una menor liberación de dopamina tras la administración

## Introducción

local con anfetamina en animales viejos (Huang et al., 1995; Kametani et al., 1995). Sin embargo, en estudios *in vitro* en el estriado se han descrito tanto reducciones (Dluzen et al., 1991) como ausencia de cambios (Thompson et al., 1981).

Por otra parte, los trabajos que han estudiado directamente el número de transportadores de DA y su afinidad por la DA han mostrado reducciones con la edad en diferentes áreas cerebrales tanto en roedores (Joseph et al., 1990; Shimizu y Prasad, 1991; Araki et al., 1997) como en humanos (Wang et al., 1997)

### 3.2.4. Efectos del envejecimiento sobre los receptores dopaminérgicos

La disminución con la edad de la densidad de receptores dopaminérgicos del tipo D2 es uno de los cambios mejor establecidos en el estriado. Este hecho se ha observado tanto en animales de experimentación como en humanos, independientemente de las técnicas utilizadas (ver revisión en (Joseph et al., 1990) y (Hyttel, 1989; Rinne et al., 1990; Morelli et al., 1990)).

En cuanto a los receptores dopaminérgicos del tipo D1, existen bastante controversia sobre si sufren o no variaciones en su densidad con el envejecimiento (ver revisión en (Joseph et al., 1990)). Así, algunos autores han descrito una disminución del número de receptores D1 durante el envejecimiento paralela a la que ocurre con los receptores D2 (Hyttel, 1989; Rinne et al., 1990; Morelli et al., 1990; Giorgi et al., 1992); sin embargo, otros autores describen que el número de receptores D1 no cambia durante el envejecimiento (O'Boyle y Waddington, 1984; Araki et al., 1997).

Se ha sugerido que la disminución del número de receptores dopaminérgicos durante el envejecimiento se podría producir como consecuencia tanto de la muerte de neuronas que expresan estos receptores como de la disminución de la síntesis de receptores dopaminérgicos en las neuronas supervivientes (Joseph et al., 1990; Giorgi et al., 1992).

---

**Tabla 1:** Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado de la rata

---

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

## **4. GABA**

### **4.1. Neurotransmisión GABAérgica**

El aminoácido neutro ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor más ampliamente distribuido en el cerebro (Mugnaini y Oertel, 1985). Tras el descubrimiento de su presencia en tejido cerebral en 1950, y la demostración de su papel neurotransmisor a partir de estudios electrofisiológicos entre 1950 y 1965, muchos estudios han sugerido su implicación en trastornos como la epilepsia, la ansiedad o la enfermedad de Parkinson (ver revisión en (DeLorey y Olsen, 1994; Cooper et al., 1996)).

#### 4.1.1. Metabolismo del GABA

La síntesis de GABA se realiza principalmente a partir de glutamato en un solo paso enzimático catalizado por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). Esta enzima requiere la presencia de piridoxal fosfato como cofactor. Existen otras vías de síntesis de GABA en el cerebro (p. ej. a partir de putrescina) aunque se consideran de menor importancia (Martin y Rimvall, 1993; DeLorey y Olsen, 1994; Cooper et al., 1996).

La GAD es una enzima citoplasmática que se encuentra localizada sólo en las neuronas GABAérgicas, por lo que se utiliza como marcador específico de estas neuronas (McGeer y McGeer, 1989). La reacción catalizada por la GAD es esencialmente irreversible, por lo que requiere de una estrecha regulación (Martin y Rimvall, 1993). Así, al menos un 50% de GAD está presente en el cerebro como apoenzima, constituyendo una reserva de GAD inactivo (Martin y Rimvall, 1993). Además, la GAD es inhibida por su producto, por  $Zn^{2+}$  y por  $\alpha$ -cetoglutarato (Cooper et al., 1996).

La degradación del GABA se realiza a través de una reacción de transaminación catalizada por la GABA transaminasa (GABA-T). En esta reacción se produce la transaminación del GABA con el  $\alpha$ -cetoglutarato para originar semialdehído succínico y GLU. El semialdehído succínico es oxidado por la semialdehído succínico deshidrogenasa a ácido succínico, el cual entra en el ciclo de Krebs. Por su parte el GLU puede ser utilizado para la síntesis de GABA (McGeer y McGeer, 1989; DeLorey y Olsen, 1994; Cooper et al., 1996). La GABA-T es una enzima mitocondrial que requiere piridoxal fosfato como cofactor. La disponibilidad de  $\alpha$ -cetoglutarato, metabólito intermedio del ciclo de Krebs, es un factor regulador importante de la actividad de la GABA-T (McGeer y McGeer, 1989; Cooper et al., 1996).

La ruta metabólica descrita se denomina "cortocircuito GABA", y constituye un pequeño anexo al ciclo de Krebs en el cerebro, que ofrece una vía alternativa entre el  $\alpha$ -cetoglutarato y el ácido succínico, cuya función principal es la biosíntesis de GABA en las terminaciones nerviosas (Martin y Rimvall, 1993; Cooper et al., 1996).

## Introducción

El cortocircuito GABA puede ser también completado en las células gliales ya que poseen todas las enzimas necesarias para la degradación del GABA captado desde el espacio sináptico (GABA-T y semialdehído succínico deshidrogenasa). El glutamato formado en los astrocitos a través de la GABA-T, que no puede ser convertido en GABA debido a la falta de GAD, es transformado por la glutamina sintetasa en glutamina, la cual pasa a las terminaciones nerviosas. En éstas, la enzima glutaminasa convierte la glutamina en glutamato manteniendo así el suministro de precursor de GABA (McGeer y McGeer, 1989; Cooper et al., 1996).

### 4.1.2. Almacenamiento, liberación e inactivación del GABA

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

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado la liberación de GABA de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  desde terminales nerviosas en respuesta a estímulos químicos despolarizantes (Nicholls, 1989; Young et al., 1990; Sved y Curtis, 1993). Esta liberación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce principalmente por exocitosis (Nicholls, 1989).

La inactivación del GABA liberado desde la terminal nerviosa se lleva a cabo a través de sistemas de transporte de alta afinidad localizados en la membrana presináptica y en los elementos gliales circundantes. Hasta la fecha se han clonado 4 transportadores de GABA con diferentes afinidades para el GABA y diferentes farmacología y localización (Attwell y Mobbs, 1994). La estequiometría de este transporte parece ser el cotransporte de 1 GABA, 1  $\text{Cl}^-$  y 2  $\text{Na}^+$  (Attwell y Mobbs, 1994).

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

### 4.1.3. Receptores GABAérgicos

Se han descrito dos tipos diferentes de receptores para el GABA, caracterizados inicialmente por su diferente sensibilidad a agonistas y antagonistas: el receptor GABA-A, sensible al agonista muscimol y al antagonista bicuculina, pero insensible al agonista baclofén; y el receptor GABA-B, insensible a la bicuculina y sensible al baclofén (DeLorey y Olsen, 1994; Cooper et al., 1996). Diversos estudios farmacológicos y moleculares sugieren la existencia de una gran variedad de

## Introducción

subtipos de receptores, tanto para el receptor GABA-A como para el GABA-B (Burt y Kamatchi, 1991; Sieghart, 1992; Bonanno y Raiteri, 1993; Bowery, 1993; Macdonald y Olsen, 1994).

El receptor GABA-A es un canal iónico con permeabilidad selectiva para el Cl<sup>-</sup>. Contiene sitios de unión específicos para GABA, picrotoxina, barbitúricos, benzodiazepinas y anestésicos esteroideos. El sitio de unión para el GABA regula la apertura del canal, requiriéndose al menos 2 moléculas de GABA para la activación del receptor (Burt y Kamatchi, 1991; Sieghart, 1992; Macdonald y Olsen, 1994). El receptor GABA-A se localiza principalmente a nivel postsináptico y es el responsable de la clásica acción inhibitoria postsináptica del GABA. La activación del receptor GABA-A produce la apertura breve del canal de Cl<sup>-</sup>, que hiperpolariza la membrana postsináptica. Las corrientes de Cl<sup>-</sup> a través del receptor GABA-A pueden verse reducidas por la acción de picrotoxina y bicuculina (agentes convulsivos) y aumentadas por la acción de benzodiazepinas, barbitúricos y anestésicos esteroideos (agentes depresores de la actividad nerviosa) (Burt y Kamatchi, 1991; Sieghart, 1992; Macdonald y Olsen, 1994).

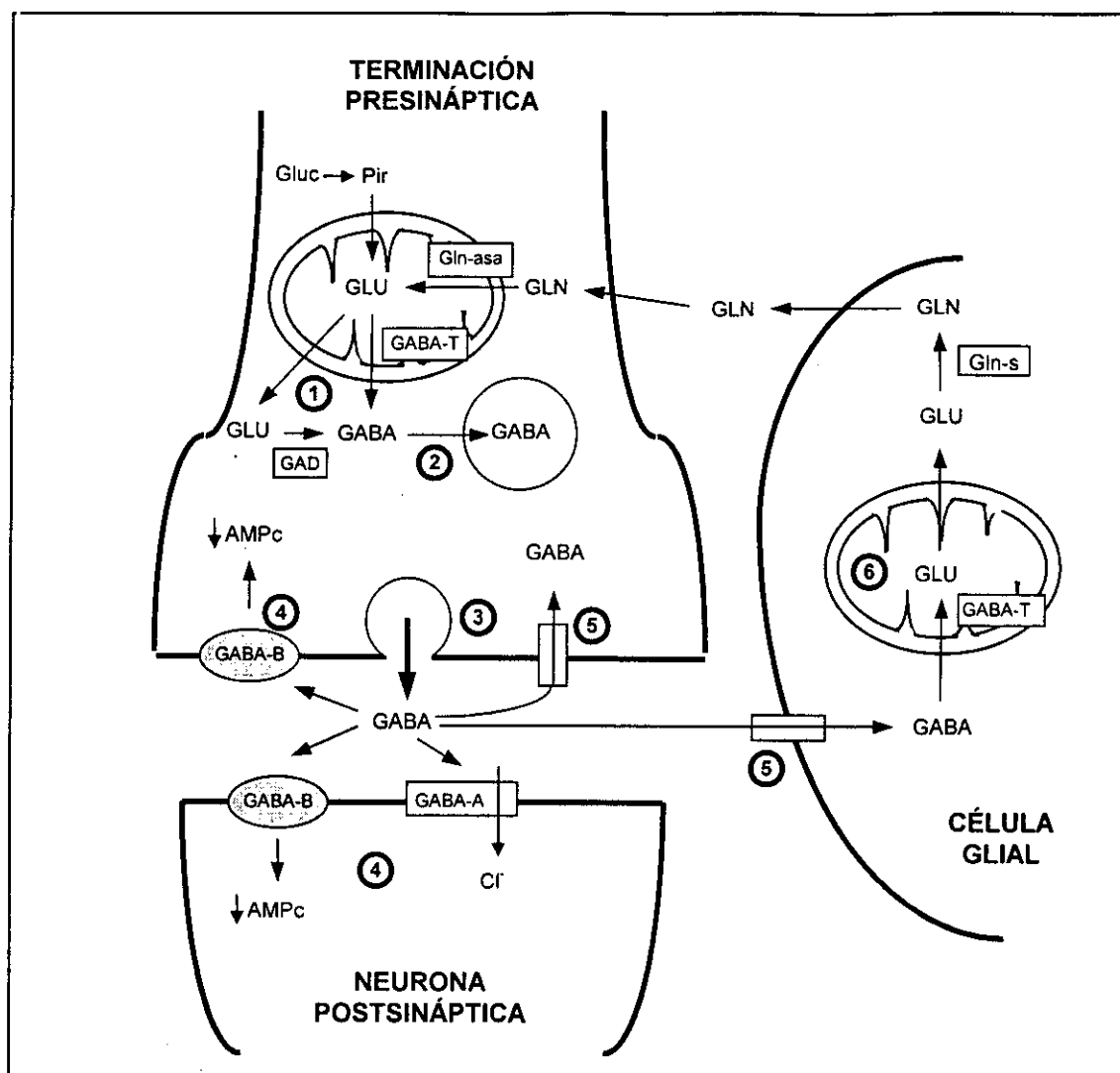
Los receptores GABA-B se descubrieron al observar la presencia de receptores para GABA en terminaciones nerviosas periféricas insensibles a bicuculina y sensibles a baclofén (Bowery et al., 1980). El receptor GABA-B está acoplado a la adenilato ciclasa a través de proteínas G y modula canales de Ca<sup>2+</sup> en terminaciones nerviosas periféricas y de K<sup>+</sup> en sinapsis centrales (Bowery, 1993; Macdonald y Olsen, 1994). Los receptores GABA-B se localizan tanto pre como postsinápticamente, predominando en un lugar o en otro según la región cerebral (Bowery, 1993). Los receptores GABA-B presinápticos inhiben la liberación de neurotransmisores tales como glutamato, noradrenalina, dopamina, serotonina y varios péptidos (substancia P, colecistoquinina, somatostatina). También actúan como autorreceptores, modulando la liberación de GABA. La activación de los receptores postsinápticos GABA-B producen potenciales postsinápticos inhibitorios (Bowery, 1993; Bittiger et al., 1993).

Recientemente se ha descrito un tercer tipo de receptores GABA, denominado GABA-C, localizado preferentemente en la retina, que es un canal de Cl<sup>-</sup> insensible a las drogas que modulan los receptores GABA-A y GABA-B y que es activado selectivamente por el ácido *cis*-4-aminocrotónico (Bormann y Feigenspan, 1995).

### 4.1.4. Vías GABAérgicas

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





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

## *Introducción*

Las neuronas GABAérgicas pueden ser tanto interneuronas, integradas dentro de circuitos locales inhibidores, como neuronas de proyección (Fagg y Foster, 1983; McGeer y McGeer, 1989). El GABA está localizado sobre todo en interneuronas en la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el hipotálamo y la retina. También existen interneuronas GABAérgicas en el estriado, el tálamo, los colículos superior e inferior, el cerebelo y la médula espinal. Las vías de proyección GABAérgicas mejor conocidas son las proyecciones de las células cerebelosas de Purkinje y de las neuronas estriatonigrales. En los últimos años se han descrito neuronas de proyección GABAérgicas, incluso en áreas donde había sido postulada su total ausencia, por ejemplo, en la corteza y el hipocampo (Fagg y Foster, 1983; Mugnaini y Oertel, 1985; McGeer y McGeer, 1989).

Los ganglios basales son la región cerebral que presenta mayor abundancia de proyecciones GABAérgicas, formando circuitos complejos donde los procesos de inhibición y desinhibición juegan un papel fundamental (Fagg y Foster, 1983; Mugnaini y Oertel, 1985; McGeer y McGeer, 1989; Kita, 1993). Se han descrito vías de proyección GABAérgica desde el estriado a la sustancia negra y al núcleo pálido y desde éste a núcleos talámicos.

### **4.2. Efectos del envejecimiento sobre la neurotransmisión GABAérgica**

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

#### **4.2.1. Efectos del envejecimiento sobre la concentración de GABA en muestras de tejido cerebral**

A diferencia del glutamato, el GABA no interviene en el metabolismo celular, por lo que el estudio de la concentración tisular de GABA nos indicaría la cantidad de GABA de que disponen las terminales GABAérgicas. Sin embargo, existen pocos estudios que hayan analizado la concentración de GABA en muestras de tejido cerebral a lo largo del envejecimiento. Sus resultados, además, son contradictorios. Por ejemplo en la corteza prefrontal dorsal se ha descrito un aumento de la concentración de GABA con la edad (Fornieles et al., 1986), aunque Donzanti y Ung (1990) no han reproducido este hallazgo. En el estriado se han descrito tanto aumentos de GABA con la edad (Donzanti y Ung, 1990; Strolin Benedetti et al., 1990) como disminuciones (Banay-Schwartz et al., 1989a). En la sustancia negra Strolin Benedetti et al. (1990) describen un aumento de la concentración de GABA mientras Banay-Schwartz et al. (1989) no detectan cambios.

Por otra parte, la actividad de la enzima de síntesis del GABA, la GAD, no parece modificarse con la edad en el estriado de la rata (Lai et al., 1981; Strong et al., 1984).

## *Introducción*

### 4.2.2. Efectos del envejecimiento sobre la liberación de GABA

No existen apenas estudios en la bibliografía mostrando los efectos del envejecimiento sobre la liberación de GABA. Recientemente se ha descrito que tanto la liberación basal como la estimulada con  $K^+$  se mantiene inalterada con la edad en el estriado de la rata (Porrás y Mora, 1995; Corsi et al., 1997).

### 4.2.3. Efectos del envejecimiento sobre los receptores GABAérgicos

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

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

## **5. RESUMEN Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

En la última década, el estudio del envejecimiento cerebral ha cobrado un gran interés debido al progresivo aumento de la edad media de las poblaciones en los países desarrollados, lo que conlleva el deterioro de las capacidades motoras, sensoriales e intelectuales y una mayor susceptibilidad a sufrir enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y demencias tipo Alzheimer. Las alteraciones bioquímicas e histológicas que tienen lugar durante el envejecimiento cerebral tienen como consecuencia el deterioro de circuitos específicos mediados por determinados neurotransmisores. Los sistemas aminérgicos, y en particular los dopaminérgicos son, posiblemente, los más afectados durante el envejecimiento (ver revisión en (Joseph et al., 1990; Makman, 1993)). También el aminoácido neurotransmisor glutamato se ve afectado durante el envejecimiento, principalmente la expresión de sus receptores, aunque en general el sistema glutamatérgico presenta una notable estabilidad (ver revisión en (Porrás et al., 1999)). Ya que no todos los sistemas neurotransmisores son igualmente afectados por el proceso de envejecimiento, es probable que el resultado final de este proceso sea un cambio en el balance entre dichos sistemas. Es por esto por lo que, en los últimos años, el estudio de la interacción funcional de diferentes sistemas neurotransmisores, concretamente entre los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos, está cobrando gran relevancia en el proceso de envejecimiento (Porrás y Mora, 1995; Expósito et al., 1995).

El estudio de la interacción entre glutamato y dopamina, y glutamato y GABA, en el estriado ha sido el foco de una intensa investigación debido, en parte, a su implicación en la patogenia de algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Carlsson y Carlsson, 1990; Greenamyre, 1993). En menor medida, también la interacción entre estos neurotransmisores en el núcleo accumbens ha sido objeto de intensa investigación. Ambas estructuras, el estriado y el núcleo accumbens, presentan características estructurales similares que sustentan la existencia de una interacción entre glutamato, dopamina y GABA. En concreto, ambas áreas reciben una extensa proyección glutamatérgica desde regiones telencefálicas así como una importante aferencia mesencefálica dopaminérgica (ver revisión en (Smith y Bolam, 1990; Groenewegen et al., 1991)). El estriado recibe aferencias glutamatérgicas desde el cortex, principalmente desde áreas frontoparietales, y proyecciones dopaminérgicas desde la sustancia negra pars compacta. Por su parte, el núcleo accumbens recibe aferencias glutamatérgicas desde estructuras límbicas como el hipocampo, corteza prefrontal y amígdala, mientras que las aferencias dopaminérgicas provienen principalmente del área ventrotectal. Una característica importante de las aferencias glutamatérgicas y dopaminérgicas al estriado y el núcleo accumbens es que convergen sobre las mismas espinas dendríticas de neuronas GABAérgicas de proyección sin realizar contactos sinápticos entre ellas (Bouyer et al., 1984; Freund et al., 1984; Sesack y Pickel, 1990; Sesack y Pickel, 1992). La existencia de este patrón sináptico sugiere la existencia de interacciones, tanto sinápticas como extrasinápticas, entre glutamato, dopamina y GABA en el estriado y el núcleo accumbens de la rata.

## Introducción

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que el glutamato puede modular la liberación de dopamina y GABA en el estriado y el núcleo accumbens de la rata (ver revisión en (Ruzicka y Jhamandas, 1993)). En efecto, la perfusión local de agonistas glutamatérgicos en el estriado y el núcleo accumbens incrementa la concentración extracelular de dopamina y GABA (Keefe et al., 1992; Morari et al., 1993; Young y Bradford, 1993; Whitton et al., 1994; Ohno y Watanabe, 1995; Kendrick et al., 1996). Recientemente, hemos mostrado que la perfusión intraestriatal del agonista NMDA incrementa la concentración extracelular de dopamina y GABA, así como la de glutamato, y que este efecto está modulado por el óxido nítrico (Segovia y Mora, 1998). Sin embargo, el uso de agonistas farmacológicos nos da sólo una información parcial de las acciones del glutamato endógeno sobre otros sistemas neurotransmisores, ya que los agonistas sólo actúan sobre un tipo específico de receptor. Una visión más fisiológica nos la daría el estudio de las acciones locales del propio neurotransmisor, el cual actuaría sobre todos sus receptores. Por eso, la aproximación experimental realizada en la presente Tesis Doctoral consistió en el incremento de las concentraciones extracelulares de glutamato endógeno, mediante el bloqueo de su recaptura, y el estudio de sus efectos sobre otros sistemas de neurotransmisores.

Para los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral, se utilizó la técnica de microdiálisis en el animal despierto, que nos permitía la administración local, a través de la cánula de microdiálisis, del bloqueante de la recaptura de glutamato, en este caso el ácido L-*trans*-pirrolididin dicarboxílico (PDC), así como la medida simultánea de los diferentes neurotransmisores estudiados. Diversos estudios han descrito que el PDC produce una inhibición selectiva y potente de la recaptura de glutamato sin interferir en la unión del glutamato a sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Bridges et al., 1991; Thomsen et al., 1994; Kanai et al., 1994; Balcar et al., 1995) ni producir daño neurotóxico (Massieu et al., 1995; Obrenovitch et al., 1996). En estudios previos de nuestro laboratorio hemos mostrado que la perfusión intracerebral de PDC incrementa la concentración extracelular de glutamato *in vivo* (Segovia et al., 1997; Del Arco y Mora, 1997).

El objetivo del presente trabajo de investigación fue el estudio de la interacción entre glutamato, dopamina y GABA en el estriado y núcleo accumbens de la rata despierta, y sus posibles cambios durante el proceso de envejecimiento. Para ello se estudió el efecto de un incremento de la concentración de glutamato endógeno, mediante la perfusión local de PDC, sobre la concentración extracelular de dopamina y GABA en ratas Wistar macho de diferentes edades. En los distintos grupos de edad se correlacionaron los incrementos de la concentración de glutamato y las posibles variaciones de la concentración extracelular de dopamina y GABA. También se estudió el efecto de la perfusión de PDC en la concentración extracelular de los metabolitos de la dopamina, DOPAC y HVA, del precursor de la síntesis de glutamato y GABA, glutamina, y de taurina, al que se le han asignado funciones neuromoduladoras. Los experimentos realizados fueron los siguientes:

1. Estudio del efecto de la perfusión intracerebral de PDC (1, 2 y 4 mM) en el estriado y núcleo accumbens de ratas jóvenes (2-4 meses).

## *Introducción*

2. Estudio de la mediación de receptores glutamatérgicos en el efecto del PDC, mediante la perfusión local de un antagonista de receptores NMDA, CPP (1 mM), y de un antagonista de receptores AMPA/kainato, DNQX (1 mM), en el estriado y núcleo accumbens de ratas jóvenes (2-4 meses).
3. Estudio del efecto de la perfusión intracerebral de PDC (1, 2 y 4 mM) en el estriado y núcleo accumbens de ratas de edad media (12-14 meses).
4. Estudio del efecto de la perfusión intracerebral de PDC (1, 2 y 4 mM) en el estriado y núcleo accumbens de ratas viejas (27-32 meses).
5. Estudio del efecto de la perfusión intracerebral de PDC (4 mM) en el estriado y núcleo accumbens de ratas muy viejas (37 meses).

El efecto del envejecimiento sobre la interacción entre glutamato, dopamina y GABA se estudió comparando en los diferentes grupos de edad dos parámetros que "cuantifican" la relación entre los incrementos de glutamato y las posibles variaciones de la concentración extracelular de dopamina y GABA:

- a) la pendiente de la recta de regresión lineal obtenida para la correlación entre las variaciones de la concentración de dopamina y GABA y los incrementos de glutamato tras la perfusión local de PDC (1, 2 y 4 mM).
- b) el cociente entre las variaciones de la concentración de dopamina y GABA y los incrementos de glutamato para los máximos incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

El estudio de los efectos del envejecimiento sobre las posibles variaciones de la concentración de DOPAC, HVA, glutamina y taurina tras la perfusión local de PDC se realizó siguiendo la misma aproximación estadística. Por último, se estudió también el efecto del envejecimiento sobre la concentración extracelular basal de aminoácidos y catecolaminas.

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

## **1. ANIMALES**

Los animales utilizados en los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral fueron ratas macho de la raza Wistar de cuatro grupos de edad: ratas jóvenes de 2 a 4 meses de edad (250-400 g); ratas de edad media de 12 a 14 meses de edad (600-750 g); ratas viejas de 27 a 32 meses de edad (600-800 g); y ratas muy viejas de 37 mese de edad (600-700 g). Las ratas fueron suministradas por el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid y por el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Granada.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, con acceso a comida y bebida ad libitum, en un ciclo luz-oscuridad invertido de 12 h (luz a las 6.30h., oscuridad a las 18.30 h.), y a una temperatura ambiental constante de 24 ° C.

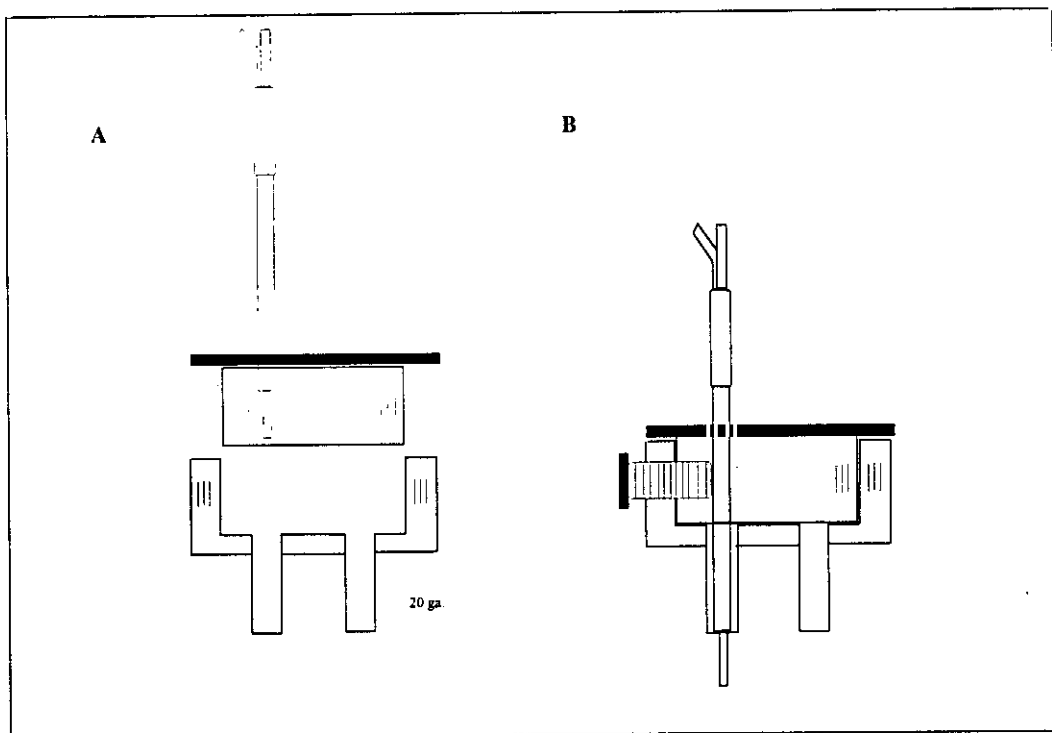


## 2. MATERIAL

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

Los implantes empleados para la perfusión intracerebral *in vivo* fueron diseñados y construidos en nuestro laboratorio (Segovia et al., 1997) (Fig. 4) y constan de los siguientes elementos:

- dos piezas acoplables macho-hembra, de metacrilato y nailon respectivamente, construidas por el Taller de Asistencia Técnica a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid.
- dos cánulas de acero inoxidable de 20 ga (diámetro exterior de 902 mm y diámetro interior de 660 mm) y una longitud de 8 mm (guías).
- dos cánulas de acero inoxidable de 24 ga (diámetro exterior de 635 mm) y una longitud de 802 mm (fiadores).
- un tornillo de 1 mm de diámetro y 5 mm de longitud.



**Fig 4:** Esquema del implante. A, imagen de ambas piezas por separado. B, acoplamiento de ambas piezas mediante el tornillo lateral de sujeción. En ambas imágenes se puede ver como se inserta la cánula de microdiálisis en el implante (Segovia et al., 1997).

## *Material y Métodos*

Las cánulas guía se unen a la base de la pieza de nailon hembra con resina epoxi (Araldit®). Este conjunto se implanta en el cráneo de la rata con el propósito de orientar el sistema de cánulas de microdiálisis hasta el área cerebral objeto de estudio. Hasta el momento del experimento, las cánulas guías permanecen ocluidas con los fiadores. Para proceder a la perfusión intracerebral se acopla la pieza de metacrilato macho en la pieza de nailon permitiendo que el extremo de la cánula (la membrana dialítica) esté protegido durante su inserción. Ambas piezas son atravesadas por un orificio perpendicular al eje principal por el que se introduce un tornillo, que impide la movilidad de la cánula una vez insertada.

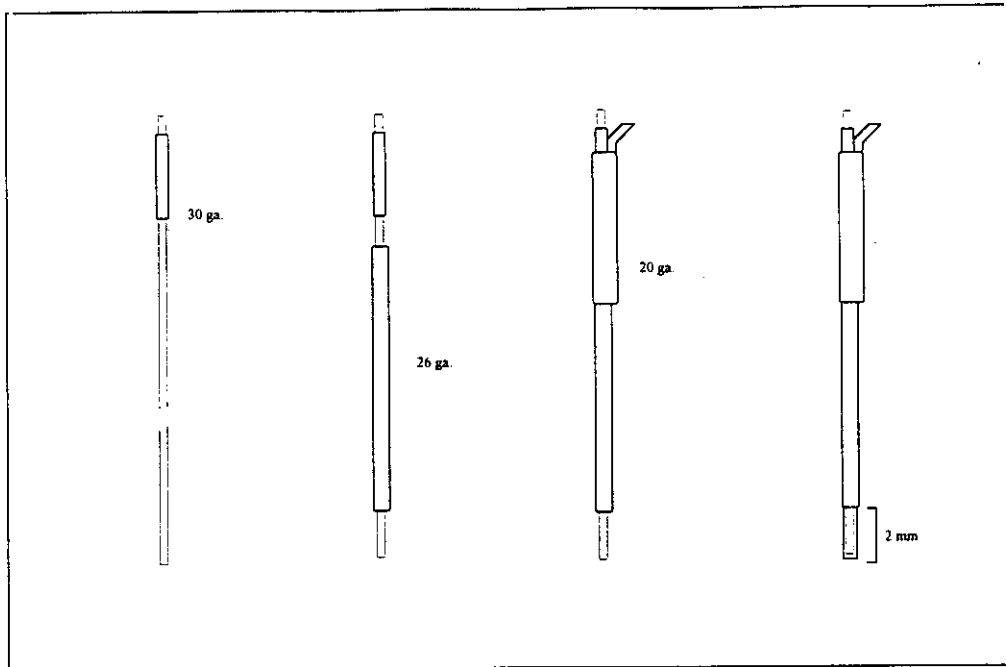
### **2.2. Construcción del sistema de cánulas de microdiálisis**

Las cánulas de microdiálisis han sido construidas según un diseño desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Segovia et al., 1997). El material utilizado en el proceso fue el siguiente:

- dos cánulas de acero inoxidable de 30 ga (diámetro exterior de 305  $\mu\text{m}$ , diámetro interior 152  $\mu\text{m}$ ) y longitud de 10 mm
- una cánula de acero inoxidable de 26 ga (diámetro exterior de 457  $\mu\text{m}$  y diámetro interior de 254  $\mu\text{m}$ ) y una longitud de 30 mm
- una cánula de acero inoxidable de 20 ga (diámetro externo de 902  $\mu\text{m}$  y diámetro interno 660  $\mu\text{m}$ ) y una longitud de 15 mm
- un capilar de silica con diámetro externo 144  $\mu\text{m}$  y diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$  y una longitud de 55 mm (Composite Metal Services LTD.)
- membrana de diálisis de cuprofano con un diámetro de 200  $\mu\text{m}$ , 8-10 mm de longitud y un tamaño de exclusión molecular de 5000 Da (Hospal).

La Figura 5 muestra el proceso de construcción de la cánula de microdiálisis; A: se une el capilar de silica a una de las cánulas de 30 ga mediante pegamento de contacto (Super Glue-3®, Loctite) de manera que la silica sobresalga alrededor de 1 mm por uno de los extremos de la cánula de acero inoxidable. B: por el extremo contrario de la silica se inserta la cánula de 26 ga. C: el conjunto de cánulas y silica se inserta en la cánula de 20 ga añadiendo, pegada a la primera, la otra cánula de 30 ga doblada en ángulo. Los extremos de la cánula de 20 ga son sellados con resina epoxi (Araldit®) de manera que quede una cámara en el interior. D: se corta el extremo más largo de la silica a una longitud de 4.5 mm; bajo una lupa y con ayuda de un hilo de tungsteno se introduce 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 2 mm de superficie de intercambio. Ambos extremos de la membrana se sellan con unas gotas de pegamento de contacto.

## Material y Métodos



**Fig. 5:** Proceso de construcción de la cánula de microdiálisis (ver texto).

### 2.3. Preparación de Equithesin

El anestésico Equithesin fue preparado en nuestro laboratorio, a partir del siguiente proceso secuencial:

- disolver 21.25 g de hidrato de cloral en 49.4 ml de etanol absoluto.
- añadir 4.86 g de pentobarbital sódico disueltos previamente en 21 ml de agua bidestilada
- agregar 198 ml de 1,2-propilénglicol.
- añadir 10.63 g de sulfato magnésico disueltos previamente en 50 ml de agua bidestilada y agua bidestilada c.s.p. 500 ml.

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* fueron estereotáxicamente implantados en el cerebro del animal mediante intervención quirúrgica. El material empleado en dicha intervención fue el siguiente:

- estereotáxico para roedores (David Kopf Instruments 900).
- bisturí (hoja Aesculap® BB515).
- 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 acrílica Denture Base Quick® (Ivoclar).
- tornillo de 3 mm de diámetro y 20 mm de longitud.

El instrumental quirúrgico, así como el implante que se va a colocar en el animal, se mantienen en una solución antiséptica (Armil al 1 por 1000) durante toda la intervención.

Antes de comenzar la operación, se controla el peso de la rata y posteriormente es anestesiada con Equitesín (2 mg/kg, intraperitoneal). Tras inducir una anestesia profunda en el animal (desaparición del reflejo corneal), éste se coloca en el estereotáxico fijando el maxilar superior a 4 mm por debajo de la línea interaural. Mediante una incisión longitudinal de la piel se deja al descubierto la calota del animal. Se abre al campo quirúrgico mediante pinzas hemostáticas y tras controlar la hemorragia secundaria al corte de los tejidos, se localiza el punto Bregma (punto de coincidencia de las suturas interparietal y frontoparietal). Este punto se utiliza como referencia para calcular dos de las coordenadas estereotáxicas correspondientes al área cerebral objeto de estudio: + 0.6 mm en el eje ántero-posterior y  $\pm$  2.5 mm en el eje lateral para el estriado; y +1.6 mm en el eje

## *Material y Métodos*

ánteroposterior y  $\pm 1.6$  mm en el eje lateral para el núcleo accumbens (König y Klippel, 1967).

A continuación, se realizan 4 orificios en el hueso, dos para el emplazamiento de los tornillos de fijación, y otros dos a través de los cuales pasan las cánulas guías. Es importante dejar la duramadre intacta al perforar los 2 últimos orificios puesto que es la referencia para calcular la tercera coordenada estereotáxica, ventral, a -2.8 mm tanto para el estriado como para el núcleo accumbens (König y Klippel, 1967).

Posteriormente, se rasga la duramadre con la punta de una aguja de insulina y se introduce el implante hasta el punto calculado.

El implante se fija a la calota con resina acrílica, de forma que queden englobados los tornillos de fijación, la base del implante y la cabeza del tornillo de 3 mm de diámetro, colocado en la parte posterior del implante con el fin de anclar el sistema de perfusión al mismo durante el experimento. Al endurecerse la resina se forma un sólido bloque que fija perfectamente el conjunto a la calota del animal.

Antes de retirar a la rata del estereotáxico se introducen los fiadores en las guías para evitar su oclusión por restos de hemorragia o de tejido. Tras la operación quirúrgica el animal es mantenido en su jaula; se hace un seguimiento diario de su peso y del estado de la herida. Los fiadores se movilizan diariamente y se limpian con etanol al 70% con el propósito de mantener desinfectadas las cánulas guías.

### **3.2. Perfusión intracerebral *in vivo*: microdiálisis**

La perfusión intracerebral *in vivo* se lleva cabo mediante el sistema de cánulas de microdiálisis descrito anteriormente. Este sistema permite el paso continuo de un líquido de perfusión a través de la membrana de diálisis ubicada en el área del cerebro estudiada. La cánula recoge las sustancias químicas presentes en el líquido intersticial merced a su paso a través de la membrana dialítica a favor de gradientes de concentración. Así se obtienen las muestras que posteriormente serán analizadas con el fin de cuantificar los componentes neuroquímicos extraídos. La longitud final de las cánulas se ajustó para que la membrana de diálisis se sitúe en el área de interés (la posición del extremo de la cánula fue: -5 mm para el estriado y -7.5 mm para el núcleo accumbens (König y Klippel, 1967)).

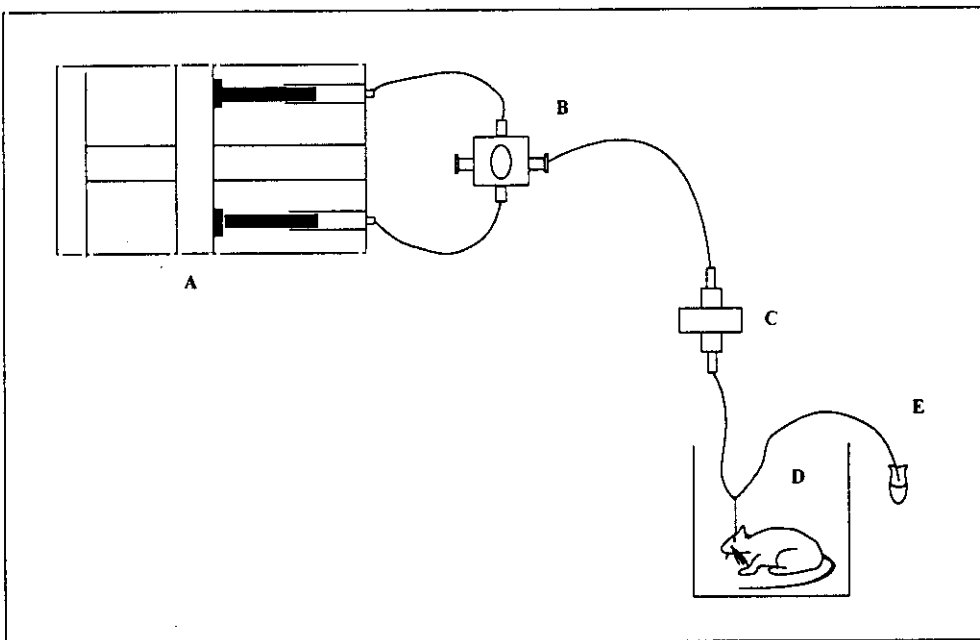
Entre 3 y 4 días después de la intervención quirúrgica se llevaron a cabo los experimentos de microdiálisis durante la fase de oscuridad del ciclo. El líquido de perfusión utilizado es un líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs), cuyo pH es de 7.3 y cuya composición fue: NaCl 137 mM; KCl 3 mM; CaCl<sub>2</sub> 3.4 mM; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM; Glucosa 3 mM. El flujo de perfusión fue 2.5 ml/min.

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

## Material y Métodos

- una bomba de infusión Harvard 22
- dos jeringas Hamilton de 2.5 ml
- una válvula Harvard HV 4-4 de cuatro vías
- un soporte giratorio (swivel), diseñado y construido en el propio laboratorio, al que se une el 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 la Figura 6, se colocan en la bomba de perfusión las jeringas cargadas con los líquidos de perfusión, y se inicia la perfusión de LCR a través de la cánula con el objetivo de crear una presión hidrostática sobre la membrana que proporcione rigidez suficiente para evitar su colapso durante la inserción en el tejido cerebral. Una vez insertada la cánula, se lleva a cabo el anclaje del sistema de perfusión al implante, para que el movimiento del animal se sincronice con el movimiento del swivel, permitiendo así el libre movimiento del animal. Finalmente se fija la cánula de microdiálisis con el tornillo perpendicular del implante (Figura 1).



**Fig. 6:** Representación esquemática del sistema completo utilizado para la realización de los experimentos mediante la técnica de microdiálisis. A, bomba de infusión; B, válvula de cuatro vías; C, swivel; D, cánula de microdiálisis; E, recogida de la muestra.

## *Material y Métodos*

Tras la inserción de la cánula en el cerebro del animal, se dejan transcurrir 3 h. antes de empezar la recogida de muestras, con el fin de permitir la estabilización de las concentraciones de aminoácidos y catecolaminas presentes en el espacio extracelular. Tras este periodo de estabilización se recogieron muestras cada 15 min durante 240 min. Las muestras obtenidas son almacenadas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

El protocolo de perfusión utilizado es el siguiente:

- 1º Periodo de estabilización (180 min).
- 2º Periodo de control (60 min), en el que se recogieron 4 muestras control para determinar la concentración extracelular basal de las sustancias analizadas.
- 3º Periodo de preestímulo (60 min), en el que mediante un giro de la válvula del sistema, se perfundieron los antagonistas de receptores glutamatérgicos, en los grupos experimentales correspondientes.
- 4º Periodo de estímulo (60 min), en el que mediante un giro de la válvula del sistema, se perfundió el PDC (1, 2 y 4 mM)
- 5º Periodo de postestímulo (60 min), en el que se estudia el efecto postestímulo de la perfusión de PDC.

### **3.3. Análisis de neurotransmisores por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

De las muestras recogidas en los experimentos de perfusión se separaron dos alícuotas antes de ser almacenadas -80 °C: una alícuota de 5 µl para el análisis de aminoácidos; y otra de 25 µl para el análisis de catecolaminas

#### **3.3.1. Detección de aminoácidos por HPLC**

Los aminoácidos presentes en las muestras recogidas del tejido cerebral *in vivo* han sido analizados mediante HPLC de fase reversa acoplado a un detector fluorométrico, según el método usado previamente en el laboratorio (Segovia et al., 1994; Segovia et al., 1997; Segovia y Mora, 1998).

##### **3.3.1.1. Derivatización de la muestra.**

Para la detección y cuantificación de los aminoácidos presentes en las muestras se realizó una derivatización precolumna con el reactivo o-ftaldialdehído-3-mercaptopropiónico (OPA-3-mercaptopropiónico).

## *Material y Métodos*

La preparación del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico requiere los siguientes componentes:

- 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)
- O-ftaldialdehído (OPA) (Sigma)

Se disuelven 32 mg de OPA en 800  $\mu\text{l}$  de metanol, a lo que se añaden 7140  $\mu\text{l}$  de una solución tampón de borato sódico 0.1 M ajustada a un pH de 9.5. Posteriormente se añaden 54  $\mu\text{l}$  de ácido 3-mercaptopropiónico. La solución debe conservarse a temperatura ambiente en un frasco opaco y cerrado. El reactivo es útil durante 15 días, aproximadamente.

La derivación precolumna se realiza llevando a cabo secuencialmente los siguientes pasos: a una alícuota de 5  $\mu\text{l}$  de muestra se le incorporan 5  $\mu\text{l}$  de estándar interno (homoserina 6.25  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente se añaden 10  $\mu\text{l}$  del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico. Esta mezcla se agita en un vórtex durante 15 segundos para favorecer la reacción. Al completarse 1 minuto desde la adición del reactivo se añaden 5 ml de una solución de ácido acético al 5% con el fin reducir el pH de la reacción (el pH óptimo de la misma es 8-9) y, por lo tanto, de detenerla.

Finalizada la derivatización, se inyectan en el cromatógrafo 20  $\mu\text{l}$  de la solución obtenida en un inyector tipo Rheodyne (*loop* de 20  $\mu\text{l}$ ). 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  $\mu\text{m}$ , un diámetro de 4.6 mm y una longitud de 15 cm.

### *3.3.1.2. Condiciones cromatográficas.*

Con el fin de lograr una separación entre picos bien definida, se ha empleado un programa de gradientes de dos fases móviles con un flujo constante de 1 ml/min.

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

- agua ultrapura obtenida de un sistema de purificación Milli-Q Plus® (Millipore) y filtrada posteriormente (filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . de poro, Millipore)
- alcohol isopropílico grado HPLC (Scharlau)
- metanol grado HPLC (Scharlau)
- tampón acetato sódico 4 M (Pierce)



## Material y Métodos

- NaOH en lentejas (Merck)
- ácido acético (Merck)

La fase móvil A consiste en una solución 95/5 (v/v) de tampón acetato sódico 50 mM y metanol, a la cual se añaden 12.5 ml de alcohol isopropílico por cada litro de mezcla. El tampón acetato sódico se prepara a partir de una solución de acetato sódico 4 M, ajustada a un pH= 5.67 con NaOH y acético glacial, y posteriormente filtrada (filtro de 0.45mm, Millipore). La fase móvil B es una solución 70/30 (v/v) de metanol y agua.

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

Se estableció un programa de gradiente de paso de ambas soluciones, presentado en la tabla 1. Los 16 primeros min. de este programa son el tiempo de análisis de la muestra; los 4 min. siguientes permiten recuperar al sistema las condiciones de inicio.

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 realizó con un detector de fluorescencia Waters 474 con un filtro de excitación de 340 nm y un filtro emisión de 460 nm.

Los datos cromatográficos han sido procesados usando el programa informático MAXIMA® 820 (Waters). Las concentraciones de aminoácidos son cuantificadas mediante el método del estándar interno (homoserina).

## Material y Métodos

### 3.3.1.3. Factor de dilución.

El hecho de realizar una derivatización precolumna de la muestra obliga a calcular el factor de dilución o volumen real de muestra que se encuentra en la solución inyectada. De acuerdo al método usado en nuestro laboratorio, 5 µl. de muestra se diluyen en un volumen final de 25 µl., de los cuales se inyectan 20 µl. en el cromatógrafo. El volumen total de muestra inyectado resultó ser, por tanto, de 4 µl. El factor de dilución se calcula hallando el cociente entre el volumen total de muestra inyectado y el volumen final inyectado, resultando ser de  $4/20 = 0.2$ . La concentración real de cada aminoácido en la muestra se calculó dividiendo la concentración cuantificada en la solución inyectada de dicho aminoácido por el factor de dilución 0.2.

### 3.3.1.4. 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 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 para identificarla. El factor de respuesta de cada sustancia pone en relación las concentraciones conocidas de esta sustancia y del estándar interno con las áreas de los picos cromatográficos.

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

### 3.3.1.5. Cálculo del coeficiente de variación.

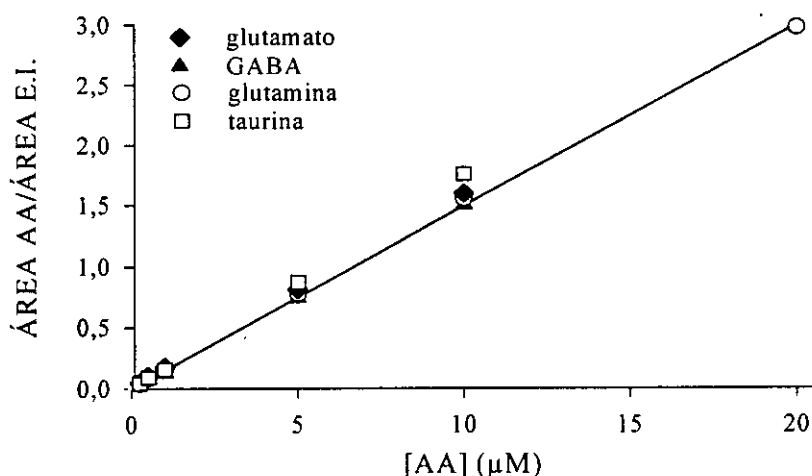
Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo 6 alícuotas de una solución patrón 1 µM. Puesto que estas inyecciones son realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método. Los coeficientes de variación (CV) obtenidos para cada aminoácido se expresan en la Tabla 5.

AMINOÁCIDO	n	MEDIA	S	C.V.
GABA	6	1.199	0.108	9.018%
TAU	6	1.271	0.097	7.660%
GLU	6	1.256	0.075	5.272%
GLN	6	1.193	0.086	7.192%

## Material y Métodos

### 3.3.1.6. 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 los aminoácidos a analizar. La representación gráfica de la relación entre el cociente área aminoácido/área del estándar interno (eje de ordenadas) y la concentración de aminoácido (eje de abscisas) se ajusta a una línea recta.



**Fig. 7:** Curva de linealidad obtenida para los aminoácidos GABA, glutamato y glutamina bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto.

### 3.3.2. Detección de catecolaminas por HPLC

Las catecolaminas presentes en las muestras recogidas del tejido cerebral *in vivo* han sido analizados mediante HPLC de fase reversa acoplado a un detector electroquímico según el método usado previamente en el laboratorio (Segovia y Mora, 1998).

La muestra se inyecta en un inyector Rheodyne (*loop* de 25  $\mu$ l), pasando primero a través de una precolumna C18 Nova-Pak® (Waters) con un tamaño de partícula de 4  $\mu$ m, un diámetro de 3.9 mm y una longitud de 20 mm; posteriormente la muestra corre a través de una columna C18 Nova-Pak® (Waters) con tamaño de partícula de 4  $\mu$ m y unas dimensiones de 3.9X150 mm.

#### 3.3.2.1. *Condiciones cromatográficas.*

Para la separación de catecolaminas se ha utilizado un programa isocrático, con un flujo constante de 1 ml/min y una sola fase móvil, lo cual permite la detección

## *Material y Métodos*

de la dopamina y sus metabolitos en 8.50 min. Para preparar la fase móvil se requieren los siguientes componentes:

- metanol grado HPLC (Scharlau)
- tampón acetato-citrato 0.1 M

La fase móvil consiste en una solución 82/18 (v/v) de tampón y metanol. El tampón acetato-citrato se prepara disolviendo en agua ultrapura (ver apartado 3.3.1.2), acetato sódico 0.1M (Merk), ácido cítrico 0.1 M (Merk), sulfonato sódico 2.9 mM (Scharlau) y EDTA 1mM (Sigma) (pH= 3.48, ajustado con HCl 1 N). Previamente a su utilización, el tampón es filtrado (filtro 0.45 mm, Millipore).

Antes de colocarla en el cromatógrafo, la solución se introduce en un baño de sonicación durante 15 min para su degasificación.

La detección de las catecolaminas se realiza con un detector electroquímico Coulochem II 5200A (ESA). Éste consta de una célula de guarda (ESA 5021), fijada a 50 mV., y dos células analíticas (5011) a 340 mV. (célula 1 o de oxidación) con una sensibilidad de 2  $\mu$ A, y -250 mV., con una sensibilidad de 5 nA (célula 2 o de reducción). Se utilizan dos células analíticas debido a la diferencia de concentraciones entre la dopamina (rango de nM) y sus metabolitos (rango de  $\mu$ M), lo que complica su detección con una única célula.

Los datos cromatográficos han sido procesados usando el programa informático MAXIMA® 820 (Waters).

### *3.3.1.2. 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 catecolamina 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 catecolaminas analizadas a partir de las soluciones madre. La calibración se realiza inyectando en el cromatógrafo patrones con diferentes concentraciones de los metabolitos (100, 200, 400, 800 y 1600 nM) y de dopamina (0.5, 1, 2 y 4 nM). El límite de detección en las muestras es de 0.25 nM para dopamina, 0.5 nM para DOPAC y 10 nM para HVA.

## Material y Métodos

### 3.3.1.3. Cálculo del coeficiente de variación.

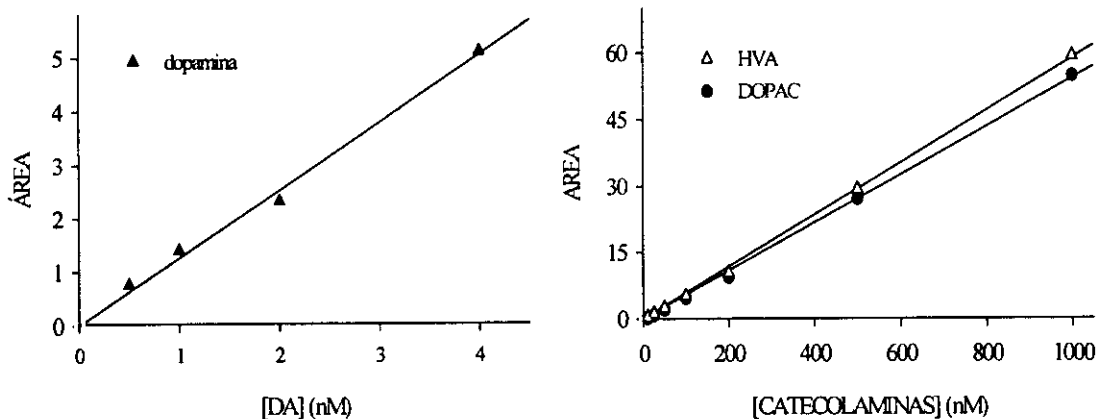
Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo 6 alícuotas de una solución patrón de 1 nM de dopamina. Puesto que estas inyecciones son realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método.

Los coeficientes de variación (CV) obtenidos para cada catecolamina se expresan en la Tabla 6.

Tabla 6: Coeficiente de variación de catecolaminas				
CATECOLAMINAS	n	MEDIA	S	C.V.
Dopamina	6	0.98	0.11	11.59 %
DOPAC	6	135.30	2.54	1.88 %
HVA	6	66.44	4.76	7.17 %

### 3.3.1.4. Linealidad del análisis cromatográfico

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



**Fig. 8:** Curva de linealidad obtenida para dopamina, DOPAC y HVA bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto.

### **3.4. Histología**

Una vez finalizados los experimentos, se comprueba 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 es el siguiente:

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

El animal es anestesiado 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 es lavada 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 estriado.

#### **4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

Para el análisis estadístico de los datos se han utilizado los siguientes métodos en función de los datos estudiados:

- a) Factorial dos direcciones, dosis-tiempos (3x16) y dosis tratamientos (3x16), para el análisis del efecto de la perfusión intracerebral de diferentes dosis de PDC (1, 2 y 4 mM), así como el efecto de la perfusión de antagonistas glutamatérgicos en las acciones del PDC (4 mM).
- b) Coeficiente de correlación de Pearson y test de independencia para el estudio en los distintos grupos de edad de la posible dependencia entre los incrementos de la concentración de glutamato y las posibles variaciones de la concentración extracelulares de dopamina, GABA, DOPAC, HVA, taurina y glutamina. Las variaciones de la concentración de las sustancias medidas se calcularon como la diferencia entre la media de las muestras en las que se perfundió el PDC (1 hora) y la media de cuatro muestras control (1 hora). Para la glutamina, sin embargo, los efectos del PDC se calcularon como la media de todas las muestras tras el comienzo de la perfusión de PDC (2 horas) menos la media de ocho muestras control (2 horas). Dado el reducido número de animales muy viejos, se analizó conjuntamente el grupo de ratas viejas y muy viejas. También se realizó un análisis de correlación para el estudio de la posible dependencia de los cocientes entre las variaciones de dopamina, GABA, DOPAC, HVA, taurina y glutamina y los incrementos de glutamato para los máximos incrementos de glutamato (PDC 4 mM) con la edad, así como de dependencia de la concentración extracelular basal de las sustancias medidas con la edad. El cálculo de los efectos del PDC se realizó según se describe en este punto.
- c) Regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y comparación de las pendientes obtenidas para la estudio en los distintos grupos de edad estudiados de la variación de la relación entre los incrementos de glutamato y las posibles variaciones de la concentración extracelulares de dopamina, GABA, DOPAC, HVA, taurina y glutamina. El cálculo de los efectos del PDC se realizó según se describe en el punto b). Dado el reducido número de animales muy viejos, se analizó conjuntamente el grupo de ratas viejas y muy viejas.
- d) ANOVA de una vía para el estudio en los diferentes grupos de edad del cociente entre las variaciones de dopamina, GABA, DOPAC, HVA, taurina y glutamina y los incrementos de glutamato para los máximos incrementos de glutamato (PDC 4 mM), así como de la concentración extracelular basal de las sustancias medidas. El cálculo de los efectos del PDC se realizó según se describe en el punto b).

## *RESULTADOS*



## Resultados

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados para esta Tesis Doctoral se han agrupado en bloques en función del grupo experimental estudiado y del diferente tratamiento farmacológico (el protocolo de perfusión intracerebral usado en todos los experimentos se describe en el apartado 3.2 de la sección "Material y Métodos"):

- Bloque 1: efecto de la perfusión intracerebral de PDC sobre glutamato, dopamina, DOPAC, HVA, GABA, taurina y glutamina en el estriado y el núcleo accumbens de ratas jóvenes (2-4 meses).
- Bloque 2: efecto de la perfusión intracerebral de un antagonista de receptores glutamatérgicos del tipo NMDA, ácido 3-[(R)-2-carboxipiperazin-4-il]-propil-1-fosfónico (CPP) (1 mM), y del tipo AMPA/kainato, 6,7-dinitroquinoxali-2,3-diona (DNQX) (1 mM) sobre las acciones del PDC en ratas jóvenes (2-4 meses).
- Bloque 3: efecto de la perfusión intracerebral de PDC sobre glutamato, dopamina, DOPAC, HVA, GABA, taurina y glutamina en el estriado y el núcleo accumbens de ratas de edad media (12-14 meses).
- Bloque 4: efecto de la perfusión intracerebral de PDC sobre glutamato, dopamina, DOPAC, HVA, GABA, taurina y glutamina en el estriado y el núcleo accumbens de ratas de edad vieja (27-32 meses) y muy vieja (37 meses).

En estos bloques los resultados se presentan en forma de gráficas. En el texto los datos de concentración se expresan en valores absolutos como  $\text{media} \pm \text{E.E.M.}$ . Las gráficas muestran, también en valores absolutos ( $\text{media} \pm \text{E.E.M.}$ ), la dinámica temporal de las concentraciones extracelulares de aminoácidos y catecolaminas en condiciones basales y tras los tratamientos farmacológicos. En los bloques 1, 3 y 4 también se muestran la correlación entre los efectos del PDC sobre aminoácidos y catecolaminas y la dosis de PDC (para el glutamato) o los incrementos de glutamato (para el resto). En el bloque 2 se muestra también la comparación entre el efecto de la perfusión de PDC solo y de PDC más CPP o DNQX. Los datos se muestran en valores relativos ( $\text{media} \pm \text{E.E.M.}$ ) tomando como 100% el efecto del PDC sin tratamiento con CPP y DNQX.

Finalmente, en los dos últimos bloques de los resultados se resume el efecto del envejecimiento sobre aminoácidos y catecolaminas:

- Bloque 5: estudio del efecto del envejecimiento sobre la concentración extracelular de glutamato, dopamina, DOPAC, HVA, GABA, taurina y glutamina en el estriado y el núcleo accumbens de la rata despierta.
- Bloque 6: estudio del efecto del envejecimiento sobre las interacciones entre glutamato, dopamina, DOPAC, HVA, GABA, taurina y glutamina en el estriado y el núcleo accumbens de la rata despierta.

## *Resultados*

En este último apartado se muestran gráficas comparando las rectas de regresión obtenidas en los diferentes grupos de edad para las correlaciones descritas en los bloques anteriores, así como gráficas comparando el cociente entre el efecto del PDC en aminoácidos y catecolaminas y el efecto del PDC en glutamato en los diferentes grupos de edad (ver sección "Métodos Estadísticos" en "Material y Métodos"). (ó "Resumen y Planteamiento del Trabajo").

## *Resultados*

### **1. EFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE PDC EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS JÓVENES**

#### **1.1 Glutamato**

##### Estriado

La concentración extracelular basal de glutamato en el estriado de ratas jóvenes fue  $0.72 \pm 0.18 \mu\text{M}$ .

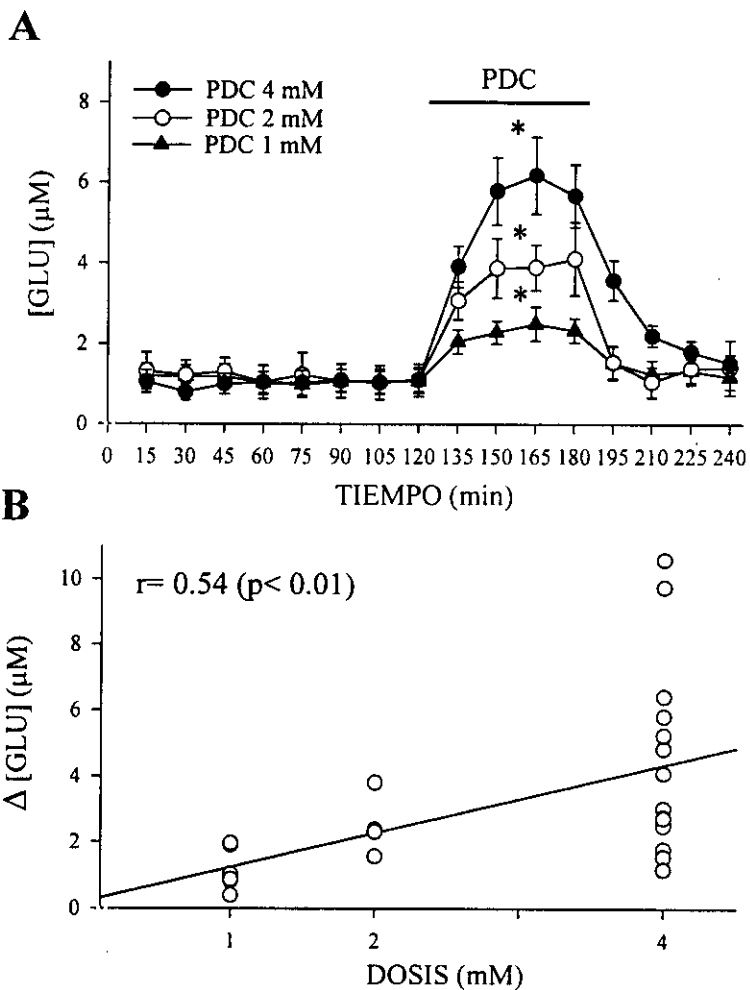
La perfusión intraestriatal de PDC (1, 2 y 4 mM) incrementó la concentración extracelular de glutamato (Fig. 9). El incremento medio de la concentración de glutamato fue:  $4.32 \pm 0.71 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $2.52 \pm 0.41 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 2 mM y  $1.15 \pm 0.20 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 9A). El incremento de la concentración de glutamato se correlacionó con la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.54$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 9B).

##### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de glutamato en el núcleo accumbens de ratas jóvenes fue  $0.26 \pm 0.04 \mu\text{M}$ .

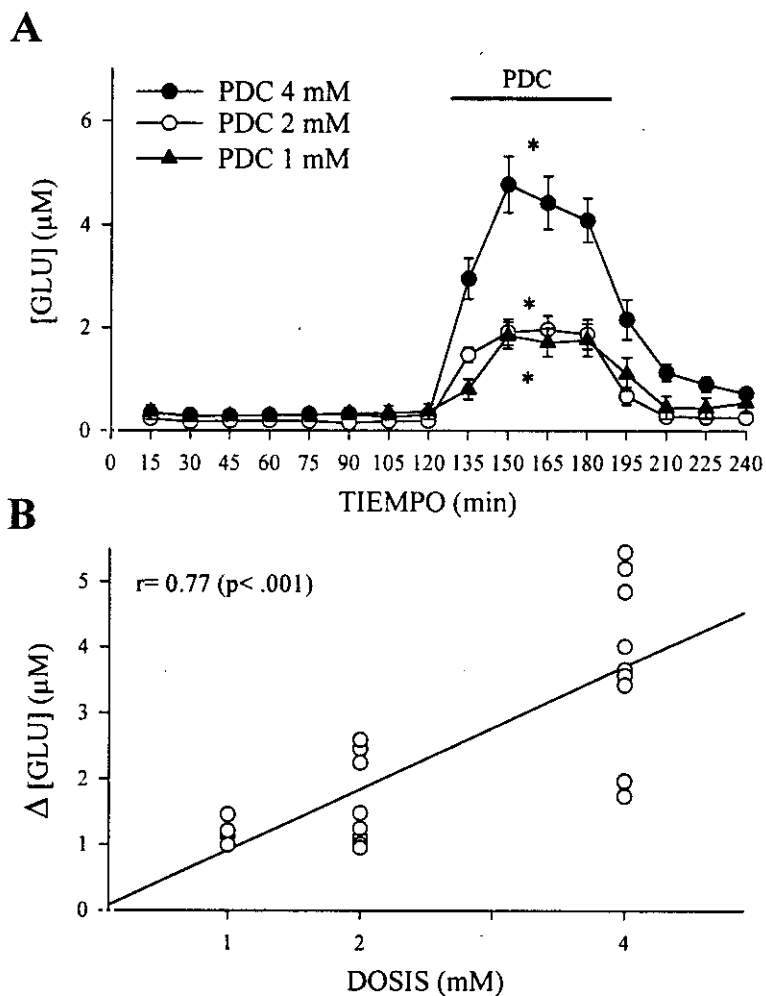
Al igual que en el estriado, la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) incrementó la concentración extracelular de glutamato (Fig. 10). El incremento medio de la concentración de glutamato fue:  $3.76 \pm 0.41 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $1.63 \pm 0.23 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 2 mM y  $1.20 \pm 0.09 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 10). El incremento de la concentración de glutamato se correlacionaron significativamente con la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.77$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 10B).

## ESTRIADO



**Figura 9:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamato en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de glutamato y la dosis de PDC.

### N. ACCUMBENS



**Figura 10:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamato en ratas jóvenes (2-4 meses) **(A)** (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). **(B)** correlación entre los incrementos de glutamato y la dosis de PDC.

## Resultados

### 1.2 Dopamina y metabolitos

#### Estriado

La concentración extracelular basal de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en el estriado de ratas jóvenes fue  $0.51 \pm 0.08$  nM,  $296.26 \pm 36.12$  nM y  $105.68 \pm 11.38$  nM, respectivamente.

La perfusión intraestriatal de PDC (4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de dopamina de  $6.08 \pm 1.88$  nM ( $p < 0.001$ ) (Fig. 11A). PDC, a la dosis de 2 mM, produjo un incremento no significativo de la concentración de dopamina de  $0.25 \pm 0.09$  nM (Fig. 11A). Las dosis de 1 mM de PDC no modificó significativamente la concentración de dopamina (Fig. 11A). Como se puede ver en la Figura 11B, los incrementos de dopamina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.77$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 11B). El análisis estadístico posterior a través del cálculo del coeficiente de correlación parcial mostró que la correlación entre los incrementos de dopamina y de glutamato en ratas jóvenes fue independiente de la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.70$ ;  $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.62$  ( $p < 0.001$ )].

La perfusión en el estriado de PDC (4 mM) disminuyó la concentración extracelular de DOPAC y HVA (Fig. 12 y 13). El descenso medio de la concentración de DOPAC y HVA fue de  $61.76 \pm 15.88$  nM ( $p < 0.001$ ) y  $26.22 \pm 5.57$  nM ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 12A y 13A). El PDC a las dosis de 1 y 2 mM no modificó significativamente la concentración de DOPAC y HVA (Fig. 12A y 13A). Los descensos de DOPAC y HVA se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato:  $r = 0.61$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 12B y 13B), sugiriendo que estos descensos han sido producidos por el glutamato. Los coeficientes de correlación parcial entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato fueron  $r = 0.48$  ( $p < 0.01$ ) para el DOPAC y  $r = 0.34$  (n.s.) para el HVA, indicando que la correlación entre los descensos de DOPAC, pero no los de HVA, y los incrementos de glutamato en ratas jóvenes fue independiente de la dosis de PDC. [NOTA: los coeficientes de correlación parcial obtenidos a partir de todos los datos en el estudio fueron  $r = 0.40$  ( $p < 0.001$ ) para el DOPAC, y  $r = 0.40$  ( $p < 0.001$ ) para el HVA].

#### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en el núcleo accumbens de ratas jóvenes fue  $0.72 \pm 0.13$  nM,  $350.98 \pm 45.50$  nM y  $83.16 \pm 6.84$  nM, respectivamente.

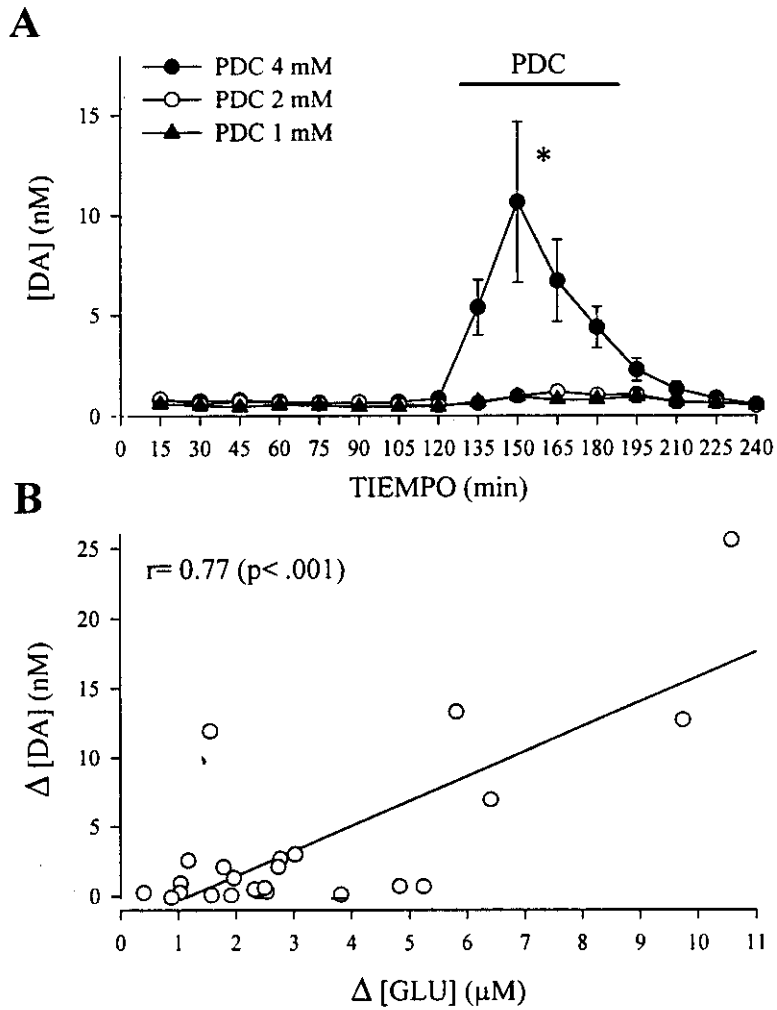
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de dopamina de  $4.34 \pm 0.86$  nM ( $p < 0.001$ ) (Fig. 14A). Las dosis de 1 y 2 mM de PDC produjeron un incremento no significativo en la

## Resultados

concentración de dopamina de  $0.75 \pm 0.35$  nM y  $0.72 \pm 0.46$  nM, respectivamente (Fig. 14A). Los incrementos de dopamina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.78$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 14B), lo cual sugiere que los incrementos de dopamina han sido producidos por el glutamato. El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de dopamina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.49$  (n.s.). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenida a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.54$  ( $p < 0.001$ )].

La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) disminuyó la concentración extracelular de DOPAC y HVA (Fig. 15 y 16). El descenso medio de la concentración de DOPAC y HVA fue de  $94.67 \pm 21.66$  nM ( $p < 0.001$ ) y  $30.56 \pm 5.23$  nM ( $p < 0.001$ ) respectivamente (Fig. 15A y 16A). El PDC a la dosis de 2 mM produjo un descenso no significativo en la concentración de DOPAC y HVA de  $66.85 \pm 25.98$  nM y  $11.80 \pm 5.12$  nM, respectivamente (Fig. 15A y 16A). Los descensos de DOPAC y HVA se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato. (Fig. 15B y 16B), sugiriendo que estos descensos han sido producidos por el glutamato. Los coeficientes de correlación parcial entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato fueron  $r = 0.14$  (n.s.) para el DOPAC y  $r = 0.05$  (n.s.) para el HVA, indicando que la correlación entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato en ratas jóvenes no fue independiente de la dosis de PDC. [NOTA: las correlaciones parciales obtenidas a partir de todos los datos en el estudio fueron  $r = 0.45$  ( $p < 0.01$ ) para el DOPAC, y  $r = 0.45$  ( $p < 0.001$ ) para el HVA].

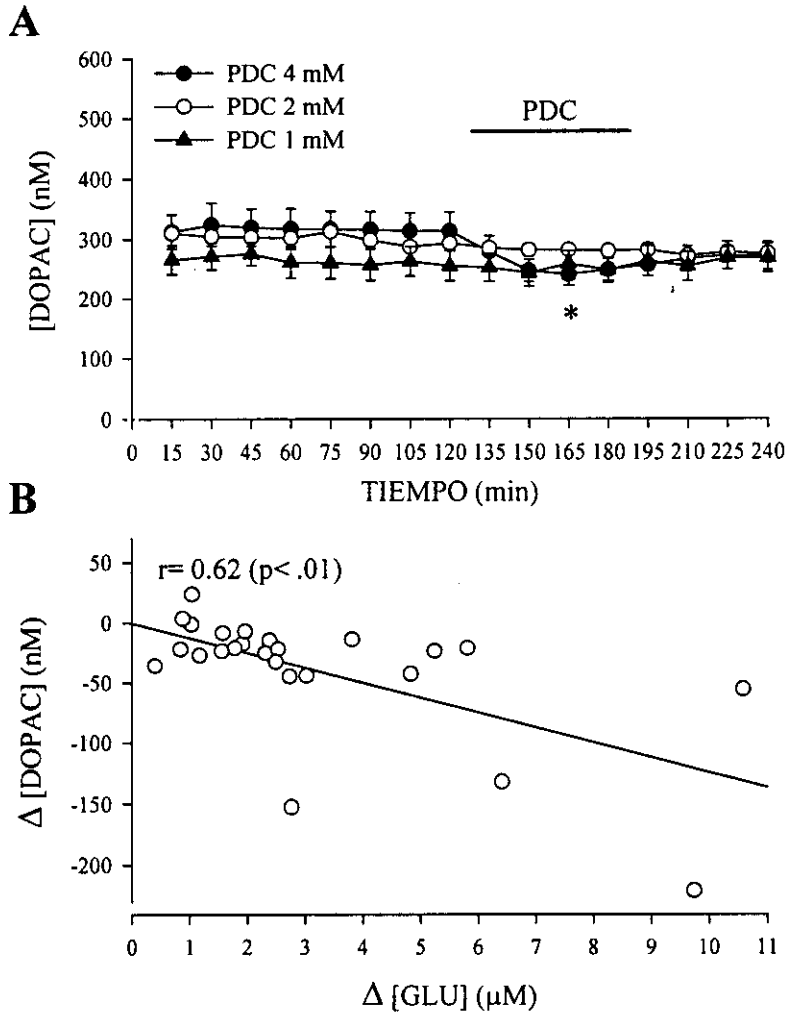
## ESTRIADO



**Figura 11:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de dopamina en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato.

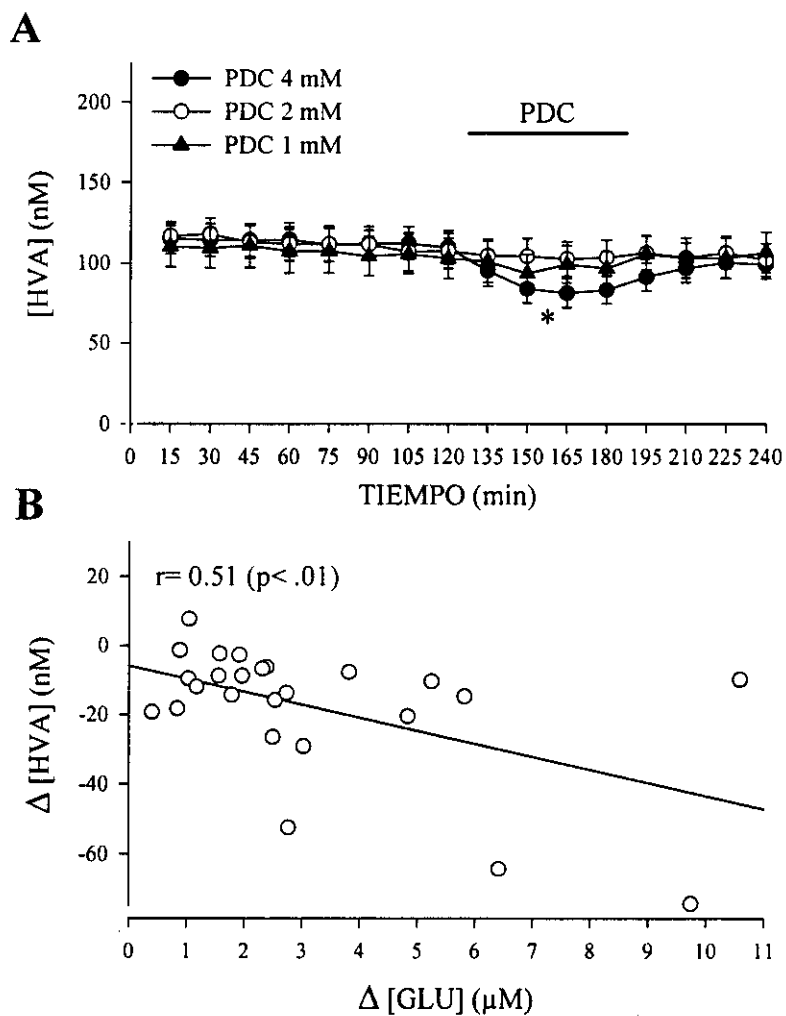


## ESTRIADO



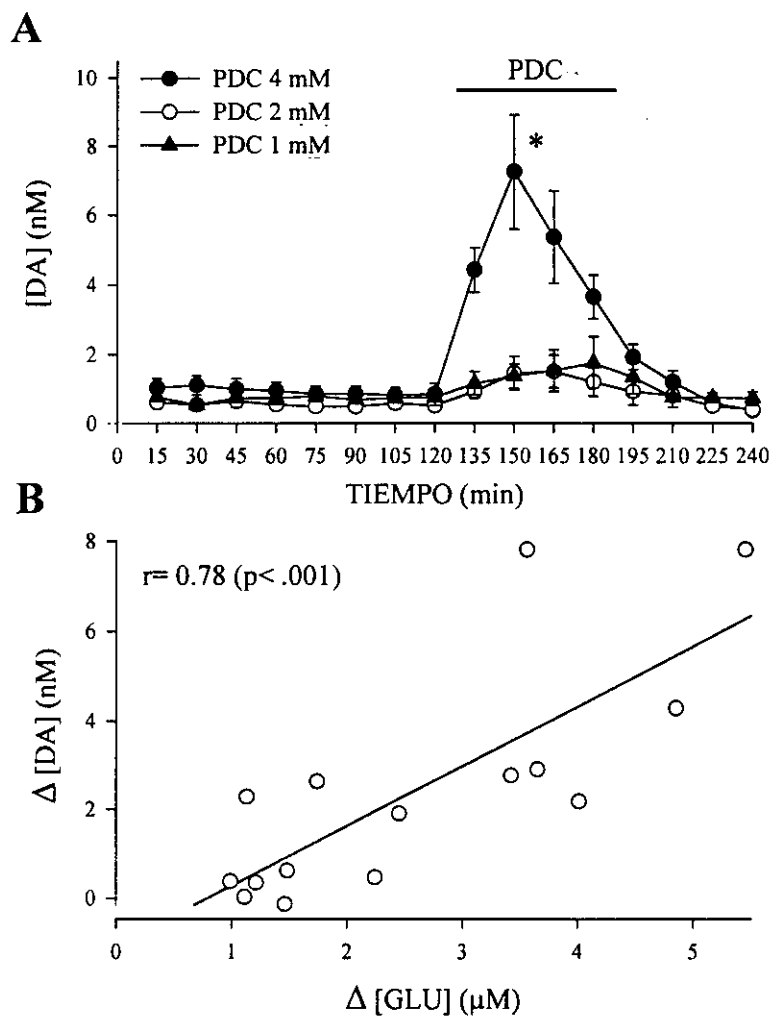
**Figura 12:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de DOPAC en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de DOPAC y los incrementos de glutamato.

## ESTRIADO



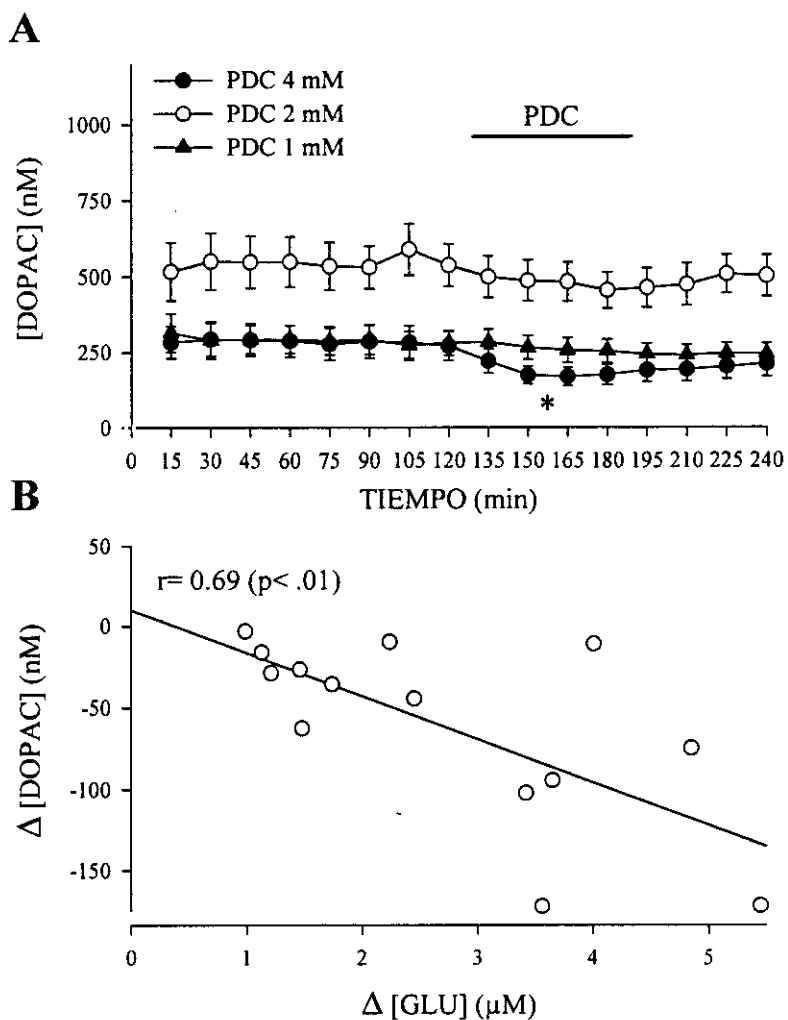
**Figura 13:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de HVA en ratas jóvenes (2-4 meses) **(A)** (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). **(B)** correlación entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato.

## N. ACCUMBENS



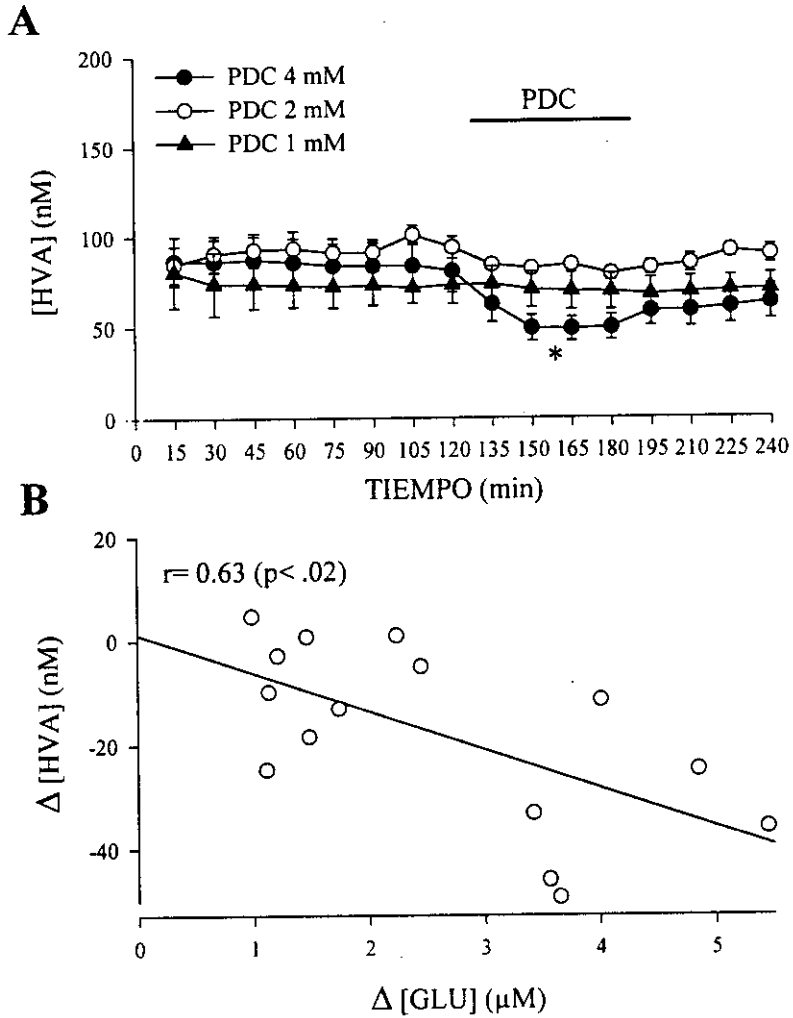
**Figura 14:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de dopamina en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato.

### N. ACCUMBENS



**Figura 15:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de DOPAC en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de DOPAC y los incrementos de glutamato.

### N. ACCUMBENS



**Figura 16:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de HVA en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato.

## Resultados

### 1.3 GABA

#### Estriado

La concentración extracelular basal de GABA en el estriado de ratas jóvenes fue  $0.11 \pm 0.01 \mu\text{M}$ .

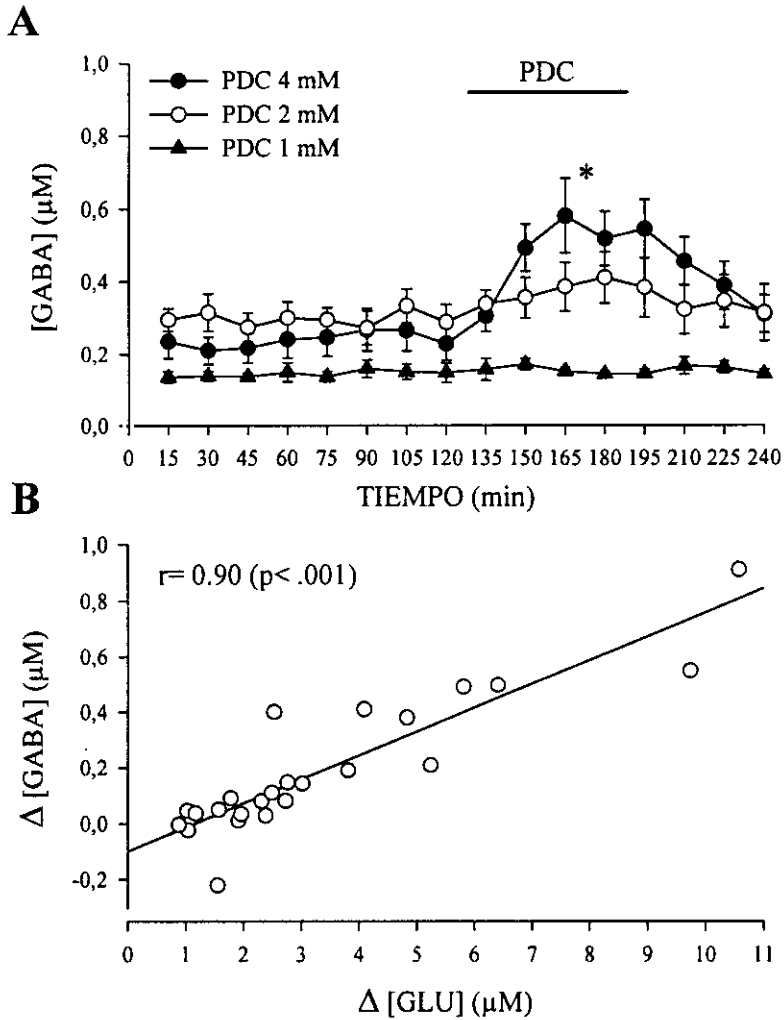
La perfusión intraestriatal de PDC (4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de GABA de  $0.28 \pm 0.07 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 17A). PDC a la dosis de 2 mM produjo un incremento no significativo de  $0.09 \pm 0.03 \mu\text{M}$  (Fig. 17A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó significativamente la concentración de GABA (Fig. 17A). La Figura 17B muestra la correlación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato ( $r = 0.90$ ;  $p < 0.001$ ). La existencia de esta correlación sugiere que los incrementos de GABA han sido producidos por el glutamato. El análisis estadístico posterior a través del cálculo del coeficiente de correlación parcial mostró que la correlación entre los incrementos de GABA y de glutamato en ratas jóvenes fue independiente de la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.70$  ( $p < 0.001$ )].

#### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de GABA en el núcleo accumbens de ratas jóvenes fue  $0.11 \pm 0.01 \mu\text{M}$ .

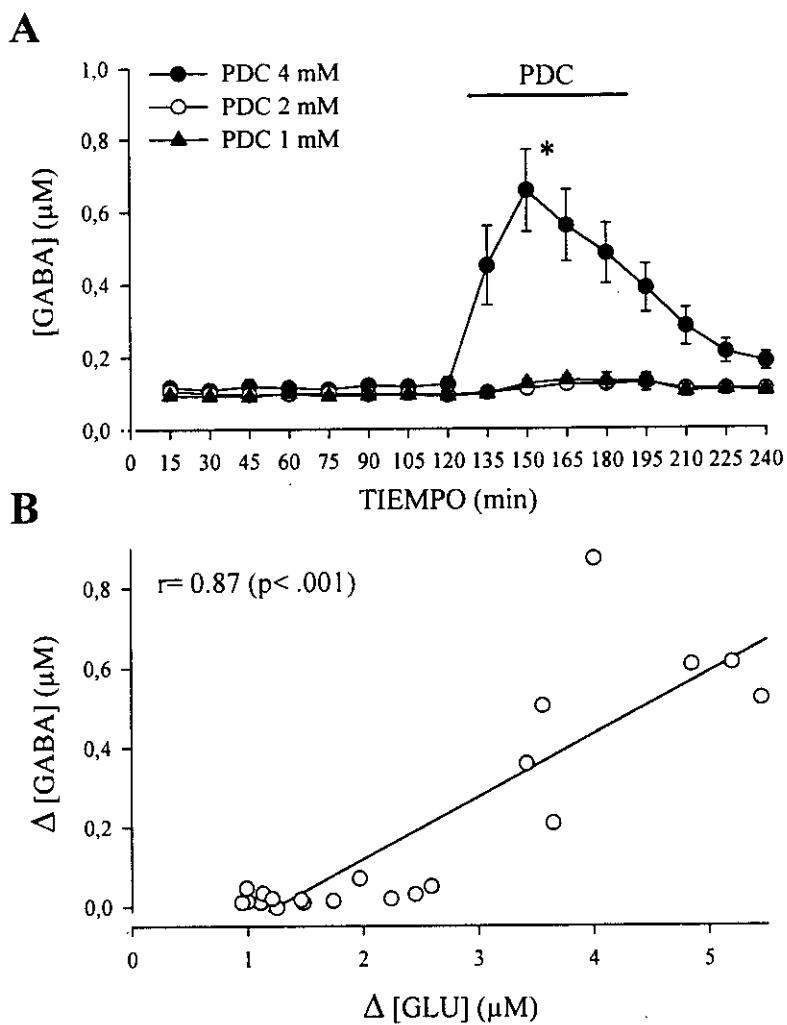
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de GABA de  $0.42 \pm 0.09 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 18A). PDC a las dosis de 1 y 2 mM produjo un incremento no significativo en la concentración extracelular de GABA de  $0.02 \pm 0.01 \mu\text{M}$  y  $0.03 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , respectivamente (Fig. 18A). Como se ve en la Figura 18B los incrementos de GABA se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.001$ ), sugiriendo que los incrementos de GABA han sido producidos por el glutamato. El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de GABA y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada en ratas jóvenes fue  $r = 0.71$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.54$  ( $p < 0.001$ )].

## ESTRIADO



**Figura 17:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de GABA en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato.

### N. ACCUMBENS



**Figura 18:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de GABA en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato.



## Resultados

### 1.4 Taurina

#### Estriado

La concentración extracelular basal de taurina en el estriado de ratas jóvenes fue  $0.99 \pm 0.11 \mu\text{M}$ .

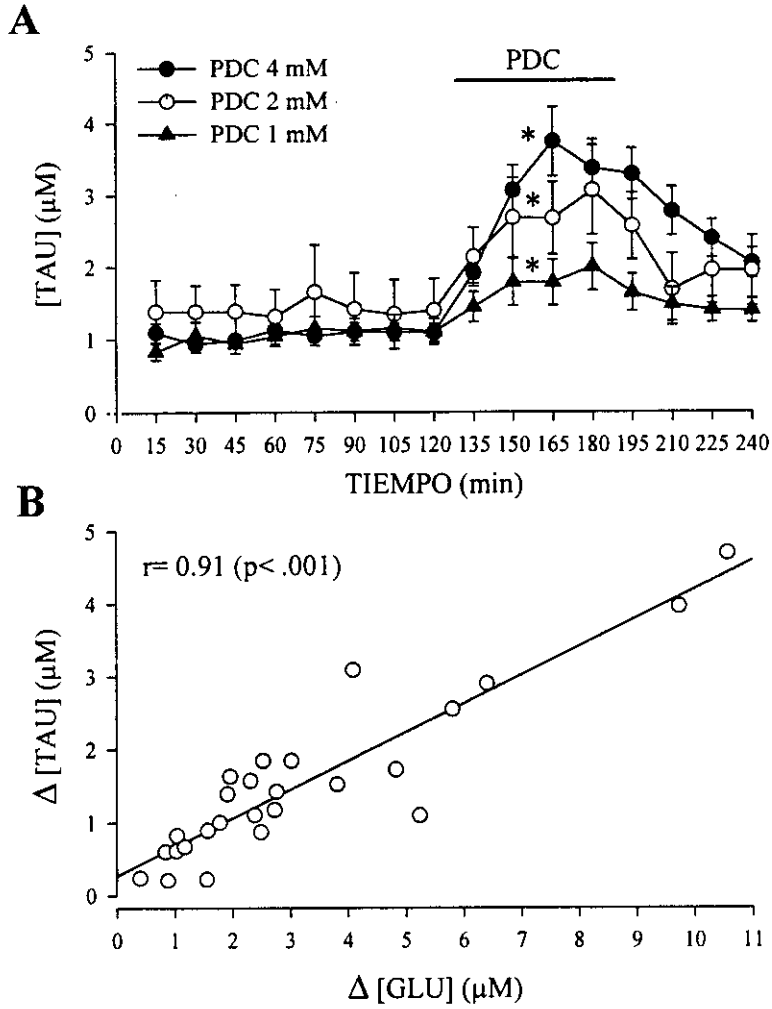
La perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de taurina (Fig. 19A). Los incrementos medios de la concentración de taurina fueron:  $1.94 \pm 0.32 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $1.27 \pm 0.14 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para a dosis de 2 mM, y  $0.78 \pm 0.19 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 19A). Como se puede ver en la Figura 19B, los incrementos de taurina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.91$ ;  $p < 0.001$ ), lo cual sugiere que los incrementos de taurina han sido producidos por el glutamato. El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de taurina y de glutamato en ratas jóvenes independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.89$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.83$  ( $p < 0.001$ )].

#### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de taurina en el núcleo accumbens de ratas jóvenes fue  $0.66 \pm 0.06 \mu\text{M}$ .

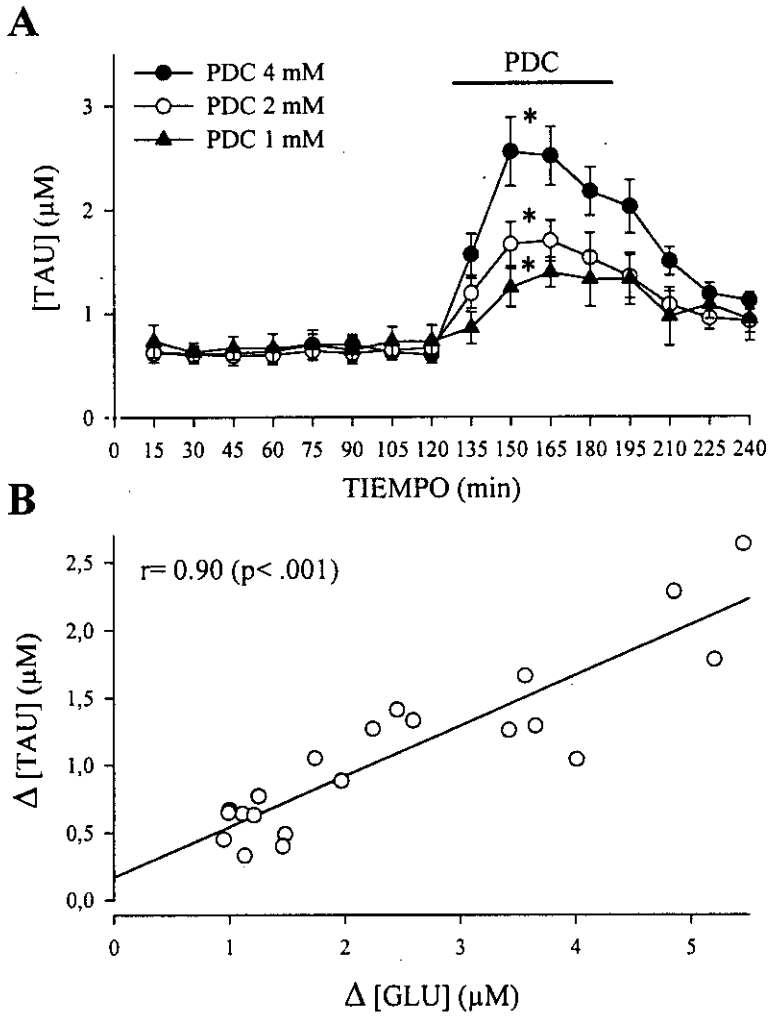
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de taurina (Fig. 20A). Los incrementos medios de la concentración de taurina fueron:  $1.54 \pm 0.19 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $0.88 \pm 0.13 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 2 mM, y  $0.5 \pm 0.07 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 20A). Como se ve en la Figura 20B los incrementos de taurina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.90$ ;  $p < 0.001$ ), sugiriendo que el glutamato es el responsable de los incrementos de taurina. El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de taurina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.80$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.83$  ( $p < 0.001$ )].

## ESTRIADO



**Figura 19:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de taurina en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato.

N. ACCUMBENS



**Figura 20:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de taurina en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato.

## 1.5 Glutamina

### Estriado

La concentración extracelular basal de glutamina en el estriado de ratas jóvenes fue  $12.94 \pm 1.34 \mu\text{M}$ . Los incrementos en la concentración de glutamato se correlacionaron con los valores de glutamina basal: el coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de glutamato y la concentración basal de glutamina independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.72$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.53$  ( $p < 0.001$ )].

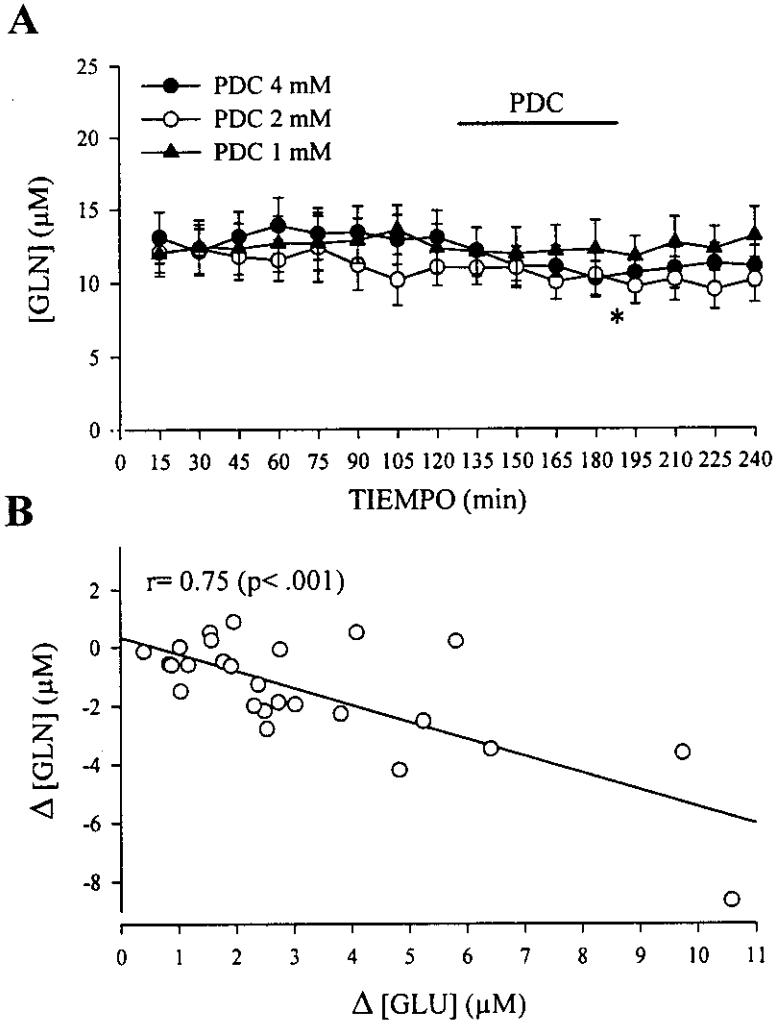
La perfusión en el estriado de PDC (4 mM) produjo un descenso de la concentración extracelular de glutamina de  $2.08 \pm 0.60 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 21A). PDC a las dosis de 1 y 2 mM no modificó la concentración de glutamina. Los descensos de glutamina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.75$ ;  $p < 0.001$ ), sugiriendo que los cambios en la concentración extracelular de glutamina han sido producidos por el glutamato (Fig. 21B). El coeficiente de correlación parcial entre los descensos de glutamina y de glutamato en ratas jóvenes independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.70$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.48$  ( $p < 0.001$ )].

### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de glutamina en el núcleo accumbens de ratas jóvenes fue  $12.03 \pm 0.66 \mu\text{M}$ . Al igual que en el estriado, los incrementos de glutamato se correlacionaron con la concentración basal de glutamina. Sin embargo, esta relación sólo se hizo evidente cuando se analizaron todos los datos en el estudio: el coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de glutamato y la concentración basal de glutamina en ratas jóvenes fue  $r = 0.13$  (n.s.) y para todos los datos en el estudio fue  $r = 0.33$  ( $p < 0.02$ ).

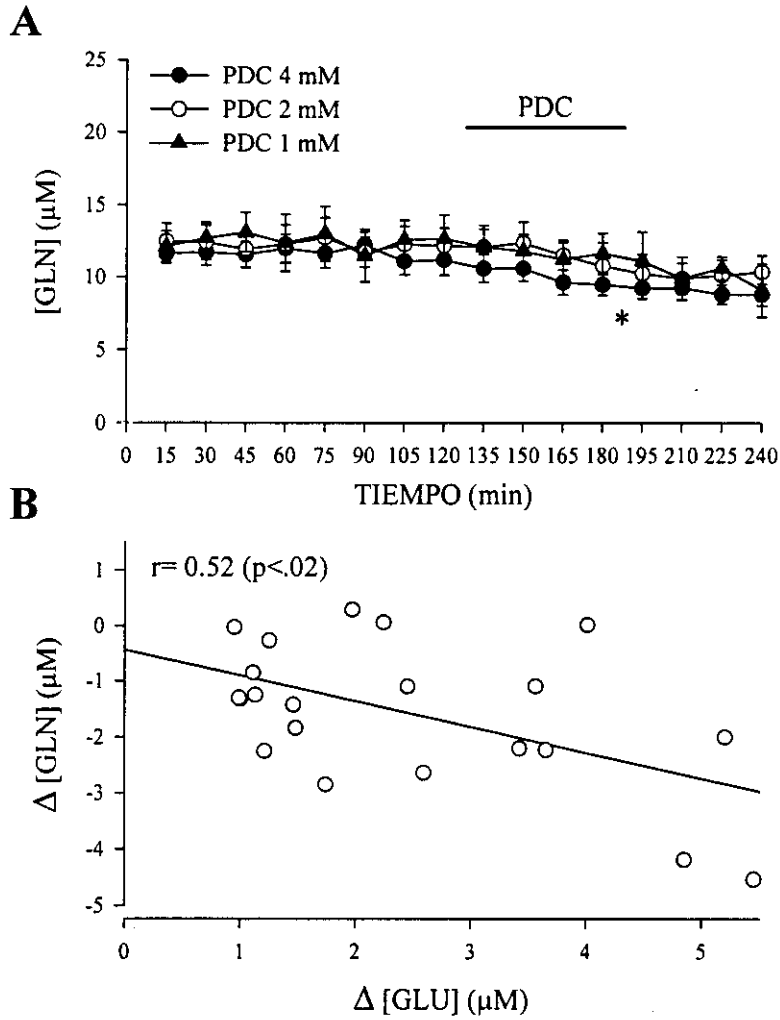
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) produjo un descenso de la concentración extracelular de glutamina de  $2.09 \pm 0.52 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 22A). PDC a las dosis de 1 y 2 mM no modificó la concentración de glutamina (Fig. 22A). Los descensos de glutamina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.52$ ;  $p < 0.01$ ), sugiriendo que el glutamato es el responsable de los descensos de glutamina (Fig. 22B). El coeficiente de correlación parcial entre los descensos de glutamina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.50$  ( $p < 0.01$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.23$  (n.s.)].

## ESTRIADO



**Figura 21:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamina en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato.

**N. ACCUMBENS**



**Figura 22:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamina en ratas jóvenes (2-4 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato.

## **2. EFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE CPP Y DNQX SOBRE LAS ACCIONES DEL PDC EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS JÓVENES**

### **2.1 Glutamato**

#### Estriado

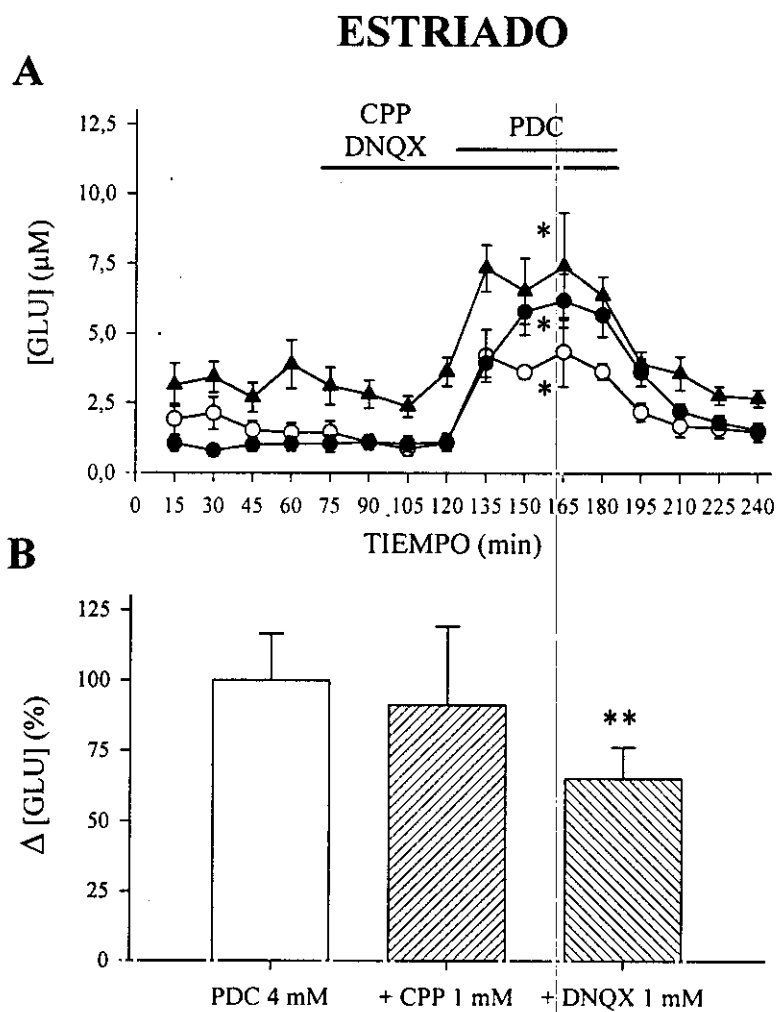
La perfusión en el estriado de CPP (1 mM) o DNQX (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de glutamato (Fig. 23A).

La perfusión intraestriatal de CPP (1 mM) no modificó los incrementos en la concentración de glutamato producidos por el PDC (4 mM) (Fig. 23B). Sin embargo, el DNQX atenuó en un 45% ( $p < 0.01$ ) los incrementos producidos por el PDC (4 mM) (Fig. 23B). Los incrementos medios de la concentración de glutamato producido por el PDC en los grupos de CPP y DNQX fueron de  $3.94 \pm 1.20 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) y  $2.81 \pm 0.48$  ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 23A).

#### Núcleo accumbens

La perfusión en el núcleo accumbens de CPP (1 mM) o DNQX (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de glutamato (Fig. 24A).

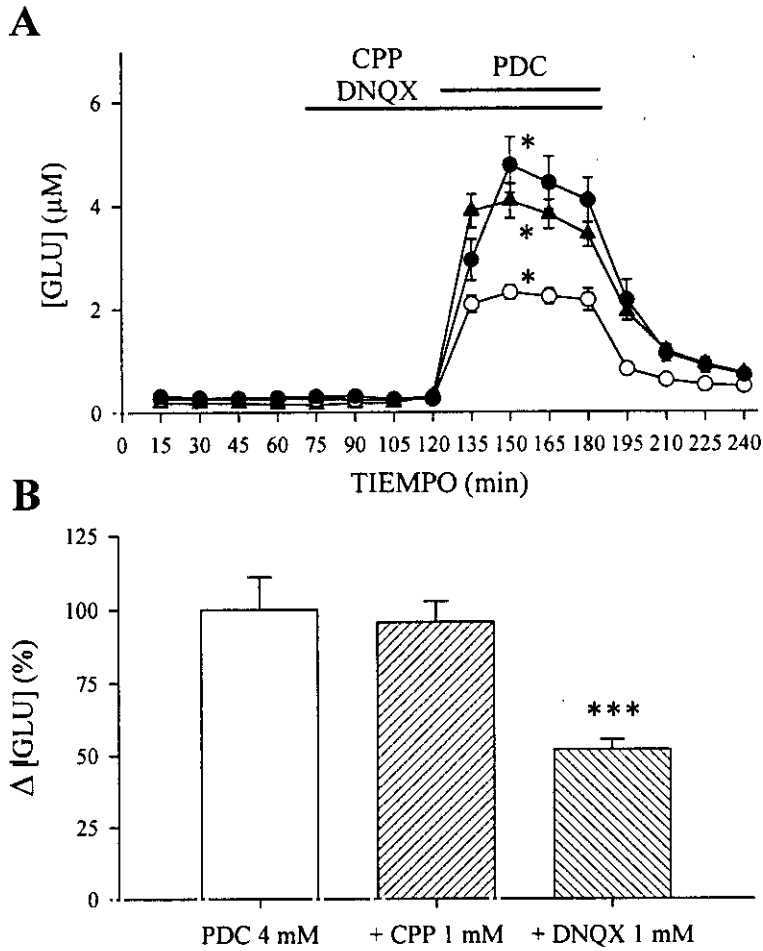
Al igual que en el estriado, la perfusión intraestriatal de CPP (1 mM) no modificó los incrementos en la concentración de glutamato producidos por el PDC (Fig. 24B). Sin embargo, el DNQX atenuó en un 48% ( $p < 0.001$ ) los incrementos producidos por el PDC (Fig. 24B). Los incrementos medios de la concentración de glutamato producido por el PDC en los grupos de CPP y DNQX fueron de  $3.60 \pm 0.26 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) y  $1.95 \pm 0.13$  ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 24A).



**Figura 23:** (A) Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de glutamato en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los incrementos de glutamato producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).



**N. ACCUMBENS**



**Figura 24:** (A) Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de glutamato en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los incrementos de glutamato producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).

## 2.2 Dopamina y metabolitos

### Estriado

La perfusión en el estriado de CPP (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de dopamina ni de sus metabolitos DOPAC y HVA (Fig. 25A, 26A y 27A). La perfusión de DNQX (1 mM) tampoco modificó la concentración extracelular de DOPAC y HVA (Fig. 26A y 27A). Como se indicó en la sección de "Material y Métodos", el DNQX provocó una alteración del análisis cromatográfico que impidió la medida de dopamina.

La perfusión intraestriatal de CPP (1 mM) redujo en un 86% ( $p < 0.001$ ) los incrementos de dopamina producidos por el PDC (4 mM) (Fig. 25B). En el grupo del CPP, el PDC produjo un incremento no significativo de la concentración de dopamina de  $0.87 \pm 0.56$  nM (Fig. 25A). El CPP también atenuó los descensos de DOPAC y HVA producidos por el PDC en un 69% ( $p < 0.001$ ) y 79% ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 26B y 27B). Los descensos medios producidos fueron de  $18.99 \pm 7.66$  nM (n.s.) para el DOPAC y  $5.57 \pm 3.58$  nM (n.s.) para el HVA (Fig. 26A y 27A).

Por su parte el DNQX (1 mM) también redujo los descensos de DOPAC y HVA producidos por el PDC en un 89% ( $p < 0.001$ ) y 100% ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 26B y 27B). Extrapolando de los resultados obtenidos del grupo de CPP, estos resultados sugieren que el DNQX puede haber atenuado también los incrementos de dopamina. El descenso de la concentración de DOPAC fue de  $7.13 \pm 7.89$  nM (n.s.) (Fig. 26A). En el caso del HVA, el DNQX revirtió los efectos del PDC produciendo un pequeño incremento no significativo de  $0.93 \pm 5.33$  nM (Fig. 27A).

### Núcleo accumbens

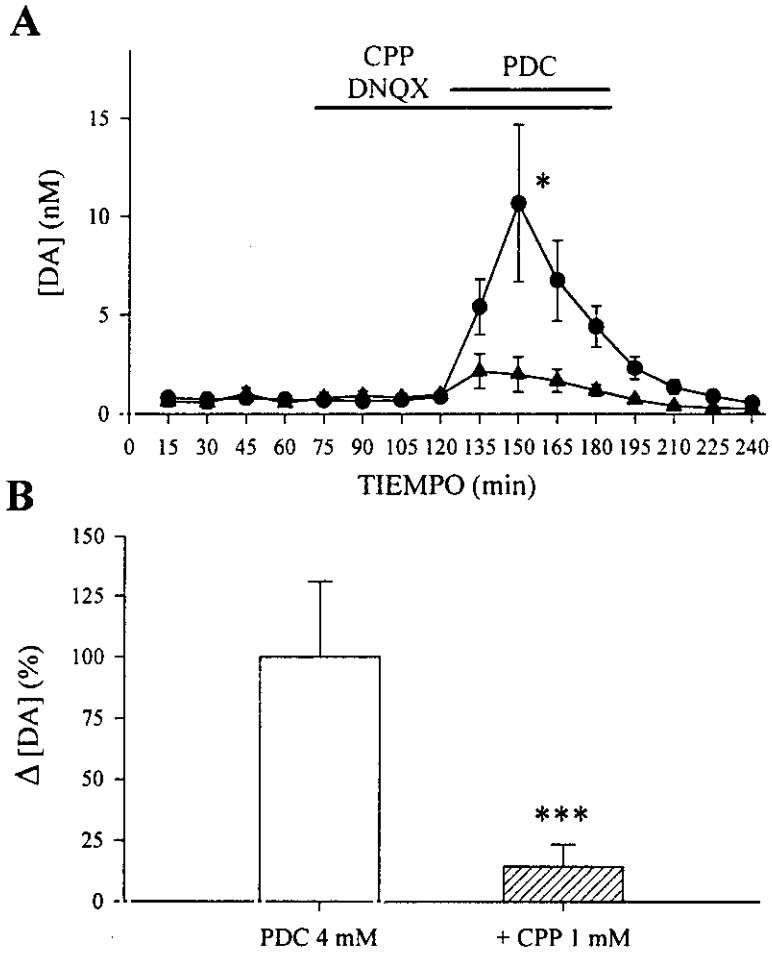
La perfusión en el núcleo accumbens de CPP (1 mM) incrementó la concentración extracelular de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA (Fig. 28A, 29A y 30A). Los incrementos máximos se obtuvieron en los últimos 15 minutos de perfusión de CPP, y fueron de  $1.00 \pm 0.31$  nM ( $p < 0.001$ ) para la dopamina,  $91.11 \pm 19.35$  nM ( $p < 0.001$ ) para el DOPAC, y  $41.91 \pm 9.37$  nM ( $p < 0.001$ ) para el HVA (Fig. 28A, 29A y 30A). Por su parte, la perfusión de DNQX (1 mM) no modificó la concentración extracelular de DOPAC y HVA (Fig. 29A y 30A).

La perfusión en el núcleo accumbens de CPP (1 mM) redujo en un 90% ( $p < 0.001$ ) los incrementos producidos por el PDC (4 mM) (Fig. 28B). El PDC produjo un incremento no significativo de la concentración de dopamina de  $0.41 \pm 0.20$  nM (Fig. 28A). Sin embargo, el CPP no modificó los descensos de DOPAC y HVA producidos por el PDC (Fig. 29B y 30B). Los descensos medios producidos fueron de  $92.92 \pm 9.89$  nM ( $p < 0.001$ ) para el DOPAC y  $34.91 \pm 6.81$  nM ( $p < 0.001$ ) para el HVA (Fig. 29A y 30A).

## *Resultados*

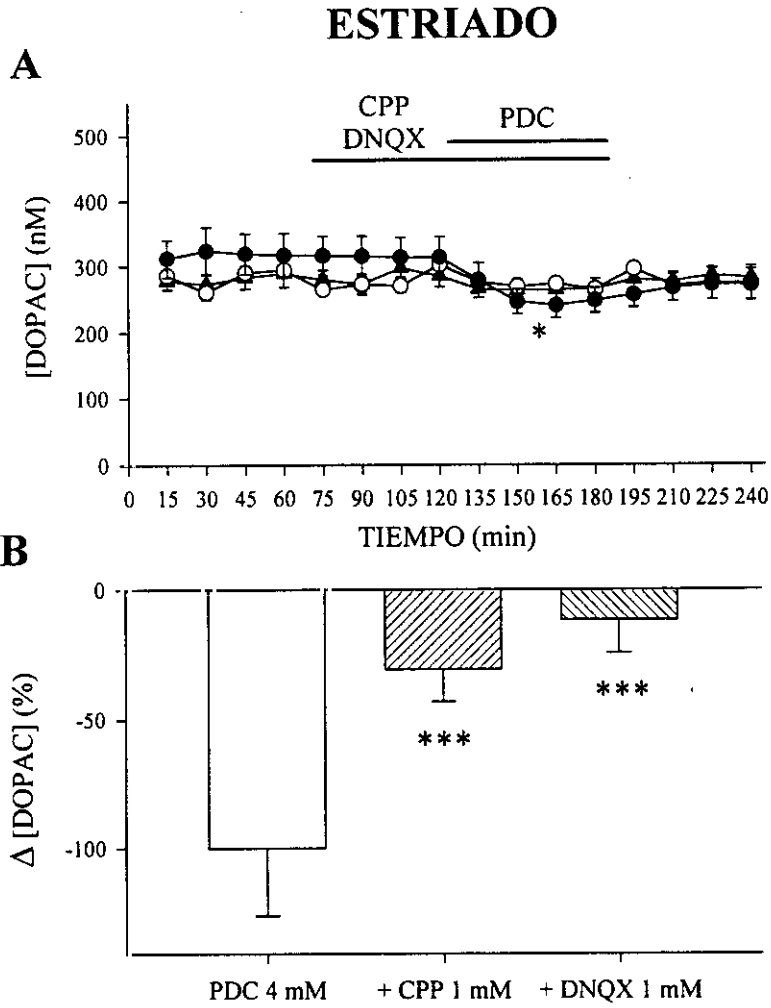
Al igual que en el estriado, el DNQX (1 mM) redujo los descensos de DOPAC y HVA producidos por el PDC en un 95% ( $p < 0.001$ ) y 100% ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 29B y 30B). Estos resultados sugieren que el DNQX puede haber atenuado también los incrementos de dopamina. El descenso de la concentración de DOPAC fue de  $5.05 \pm 12.14$  nM (n.s.) (Fig. 29A). En el caso del HVA, el DNQX revirtió los efectos del PDC produciendo un pequeño incremento no significativo de  $0.98 \pm 4.92$  nM (Fig. 30A).

## ESTRIADO

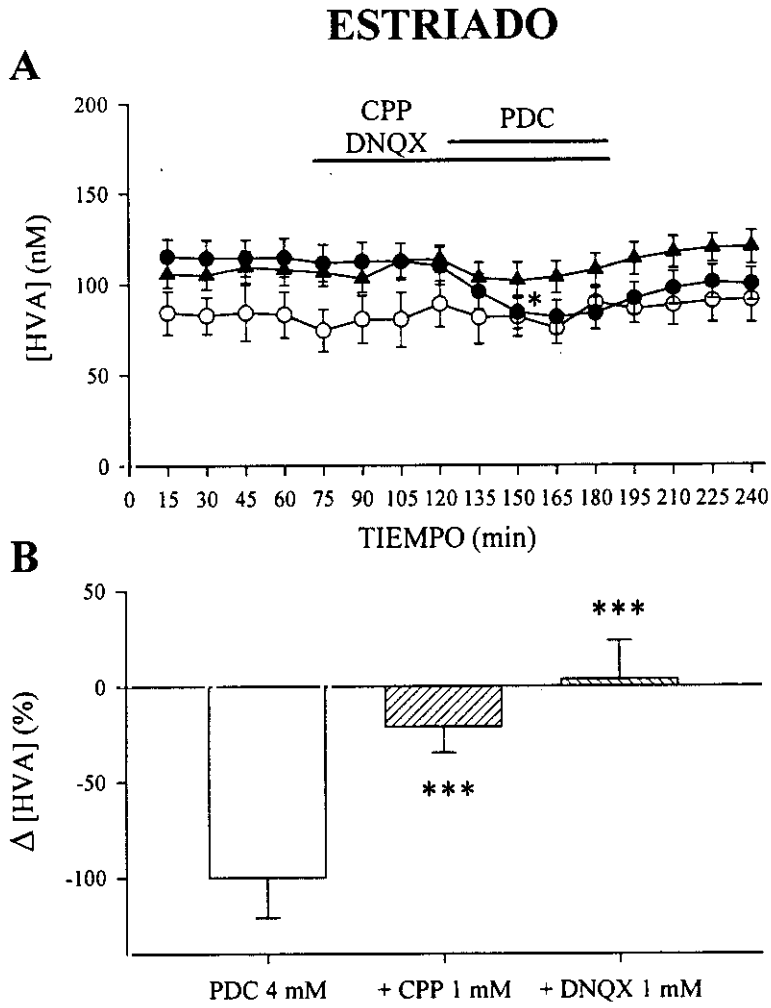


**Figura 25:** (A) Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de dopamina en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los incrementos de dopamina producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).

Resultados

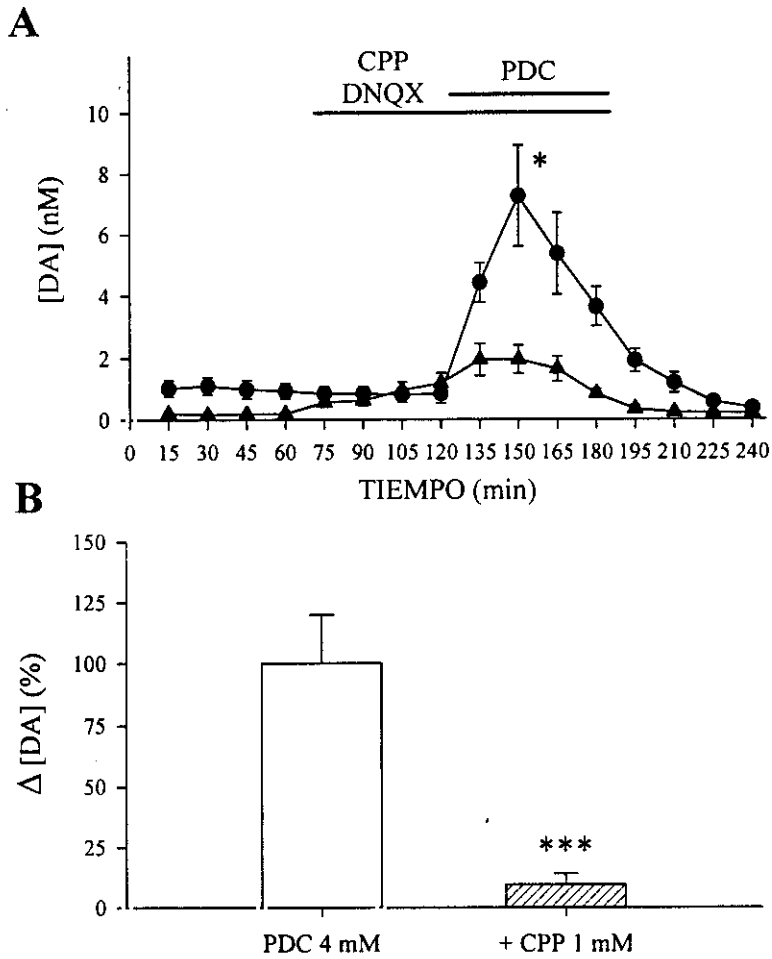


**Figura 26:** (A) Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de DOPAC en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los descensos de DOPAC producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).



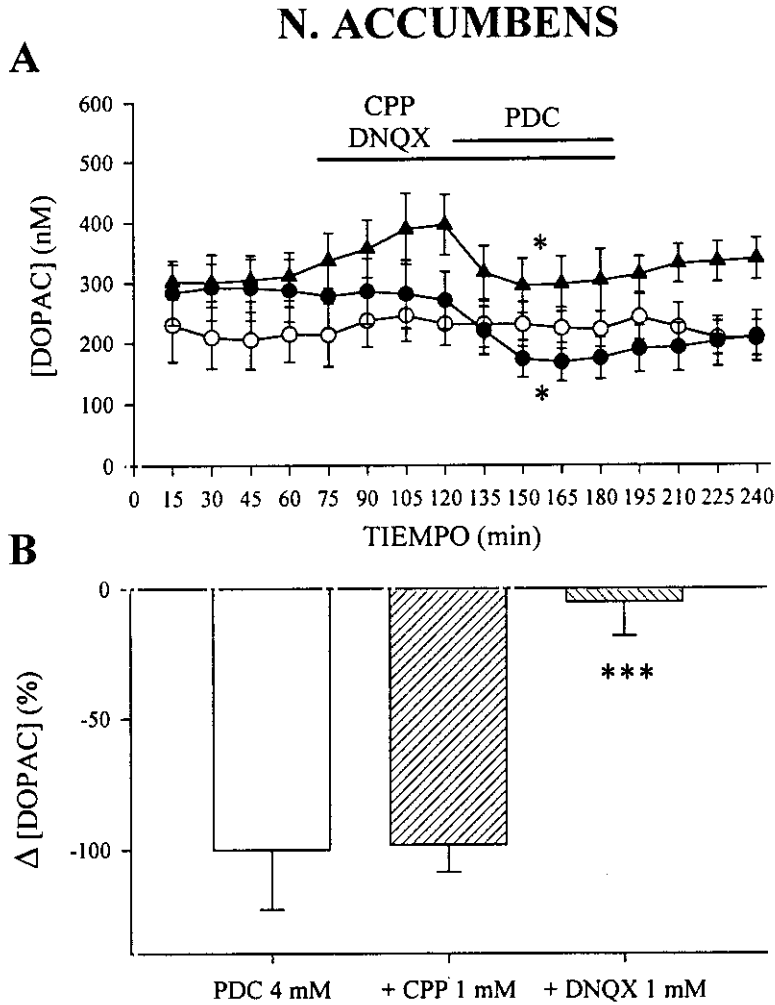
**Figura 27:** (A) Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de HVA en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los descensos de HVA producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).

**N. ACCUMBENS**



**Figura 28:** (A) Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de dopamina en ratas jóvenes (2-4 meses) (\* p< 0.05 comparado con su control). (B) Comparación entre los incrementos de dopamina producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*) p< 0.001 comparado con el grupo de PDC 4 mM).

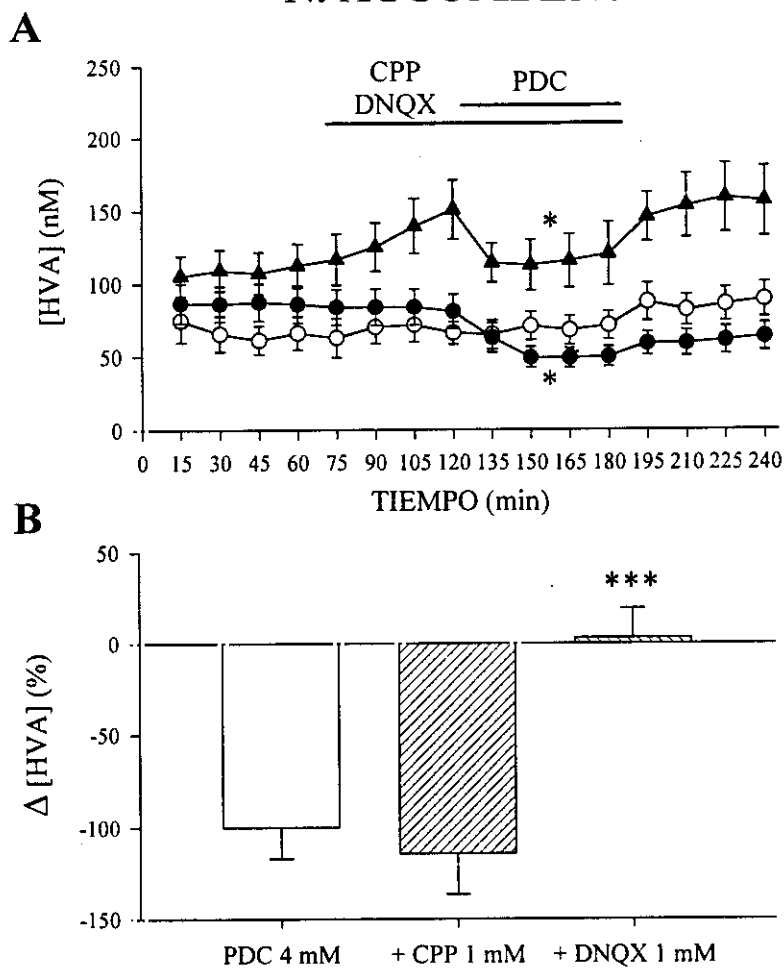
Resultados



**Figura 29:** (A) Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de DOPAC en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los descensos de DOPAC producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).



**N. ACCUMBENS**



**Figura 30:** (A) Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de HVA en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los descensos de HVA producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).

## Resultados

### 2.3 GABA

#### Estriado

La perfusión en el estriado de CPP (1 mM) o DNQX (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de GABA (Fig. 31A).

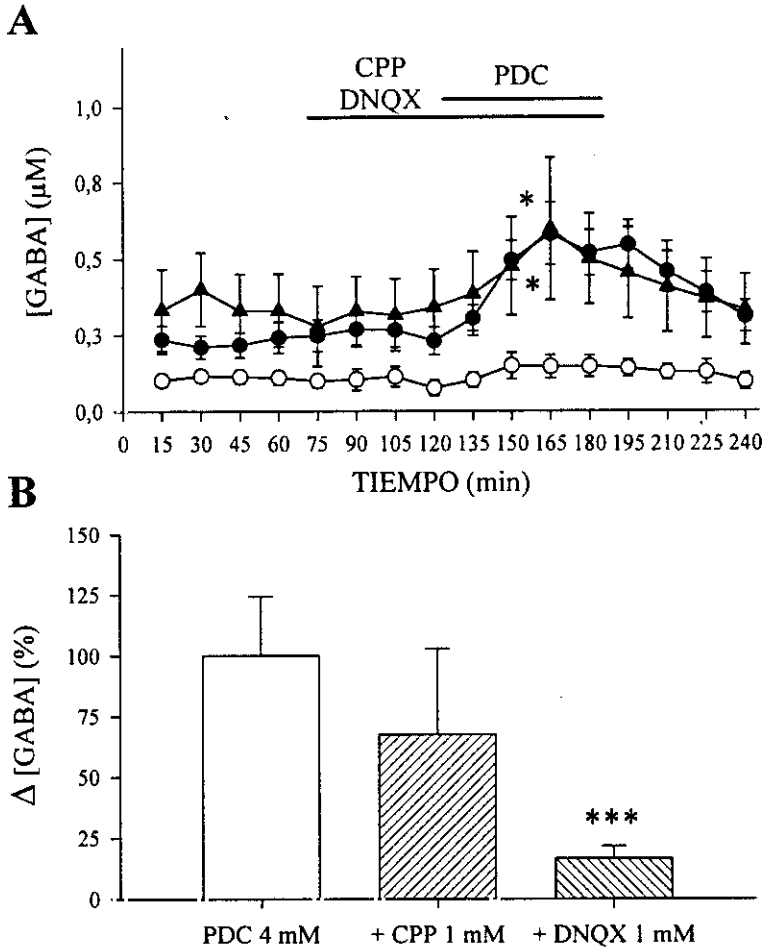
La perfusión intraestriatal de CPP (1 mM) atenuó de forma no significativa los incrementos en la concentración de GABA producidos por el PDC (4 mM) en un 23% (Fig. 31B). Por su parte, el DNQX atenuó en un 83% ( $p < 0.001$ ) los incrementos producidos por el PDC (4 mM) (Fig. 31B). Los incrementos medios de la concentración de GABA producido por el PDC en los grupos de CPP y DNQX fueron de  $0.19 \pm 0.10 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) y  $0.05 \pm 0.01$  (n.s.), respectivamente (Fig. 31A).

#### Núcleo accumbens

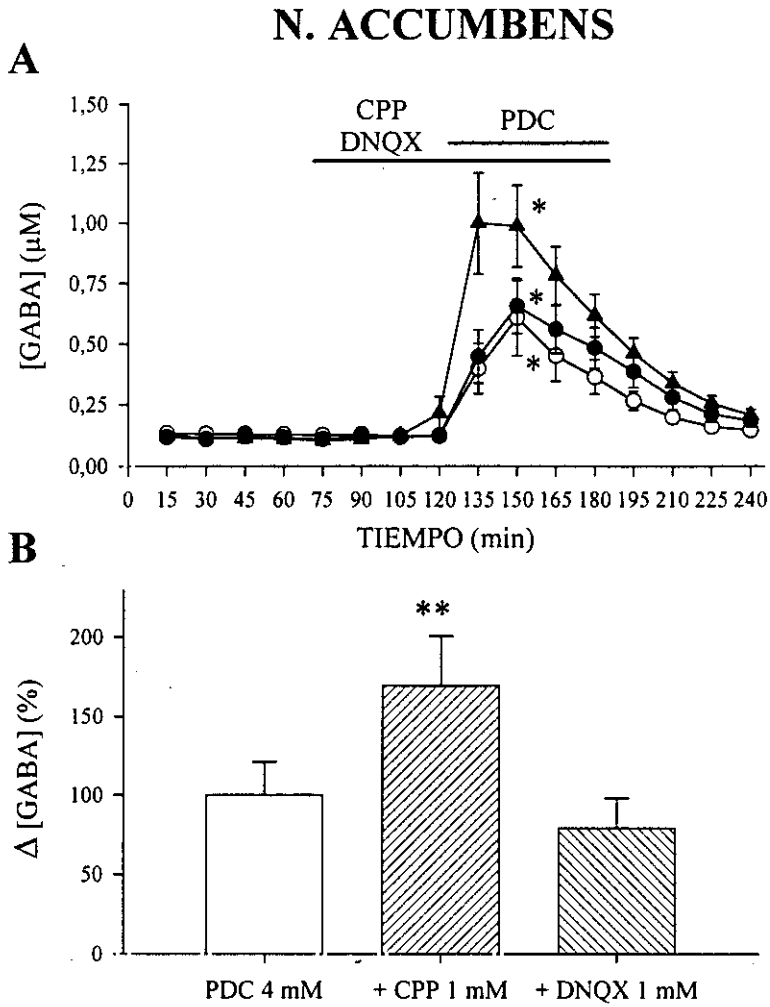
La perfusión en el núcleo accumbens de CPP (1 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular basal de GABA que sólo fue significativo en los últimos 15 minutos de perfusión del CPP (Fig. 32A). Este incremento fue de  $0.10 \pm 0.07 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ). Por su parte, la perfusión de DNQX (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de GABA (Fig. 32A).

Sorprendentemente, la perfusión en el núcleo accumbens de CPP (1 mM) potenció en un 51% ( $p < 0.01$ ) los incrementos en la concentración de GABA producidos por el PDC (Fig. 32B). Por el contrario, el DNQX atenuó de forma no significativa los incrementos de GABA en un 21% (Fig. 32B). Los incrementos medios de la concentración de GABA producido por el PDC en los grupos de CPP y DNQX fueron de  $0.63 \pm 0.10 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) y  $0.33 \pm 0.08$  ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 32A).

## ESTRIADO



**Figura 31:** (A) Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de GABA en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los incrementos de GABA producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).



**Figura 32:** (A) Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de GABA en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los incrementos de GABA producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).

## *Resultados*

### **2.4 Taurina**

#### Estriado

La perfusión en el estriado de CPP (1 mM) o DNQX (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de taurina (Fig. 33A).

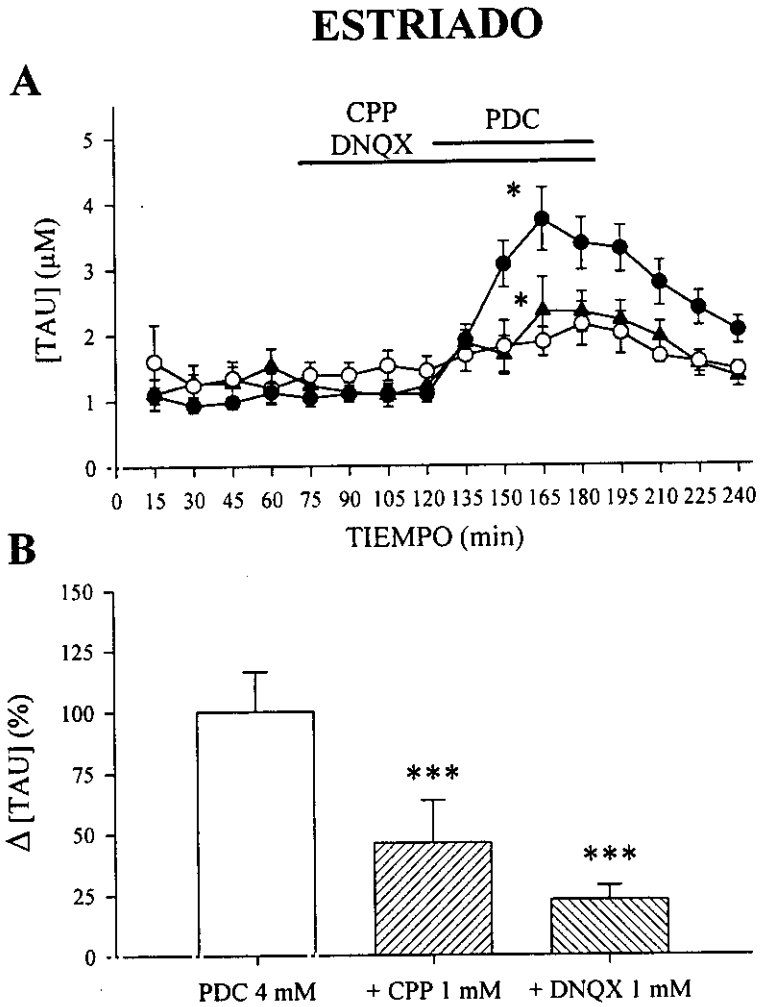
La perfusión intraestriatal tanto de CPP (1 mM) como de DNQX (1 mM) atenuó los incrementos en la concentración de taurina producidos por el PDC (4 mM) en un 54% ( $p < 0.001$ ) y en un 77% ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 33B). Los incrementos medios de la concentración de taurina producidos por el PDC en los grupos de CPP y DNQX fueron de  $0.89 \pm 0.34 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) y  $0.44 \pm 0.11$  (n.s.), respectivamente (Fig. 33A).

#### Núcleo accumbens

La perfusión en el núcleo accumbens de CPP (1 mM) o DNQX (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de taurina (Fig. 34A).

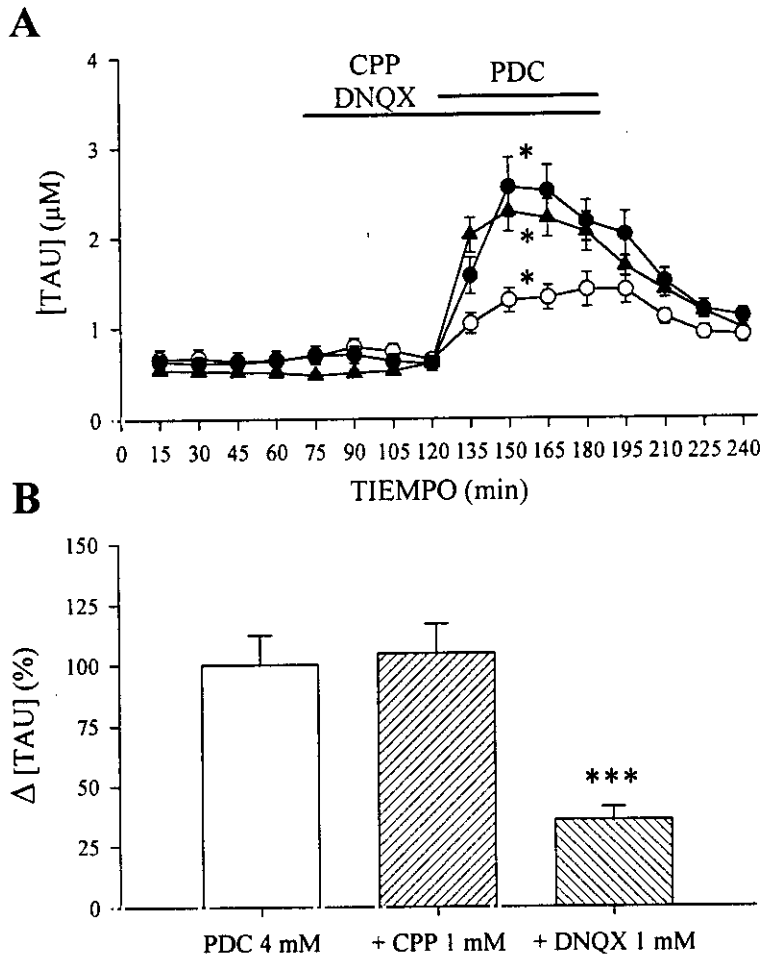
La perfusión en el núcleo accumbens de CPP (1 mM) no modificó los incrementos en la concentración de taurina producidos por el PDC (Fig. 34B). Por el contrario, el DNQX atenuó en un 64% ( $p < 0.001$ ) los incrementos de taurina (Fig. 34B). Los incrementos medios de la concentración de taurina producido por el PDC en los grupos de CPP y DNQX fueron de  $1.61 \pm 0.19 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) y  $0.55 \pm 0.10$  ( $p < 0.01$ ), respectivamente (Fig. 34A).

Resultados



**Figura 33:** (A) Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de taurina en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los incrementos de taurina producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).

N. ACCUMBENS



**Figura 34:** (A) Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de taurina en ratas jóvenes (2-4 meses) (\* p < 0.05 comparado con su control). (B) Comparación entre los incrementos de taurina producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*) p < 0.001 comparado con el grupo de PDC 4 mM).

## Resultados

### 2.5 Glutamina

#### Estriado

La perfusión en el estriado de CPP (1 mM) produjo un descenso significativo de la concentración extracelular basal de glutamina de  $1.52 \pm 0.51 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) (Fig. 35A). La perfusión de DNQX (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de glutamina en el estriado (Fig. 35A).

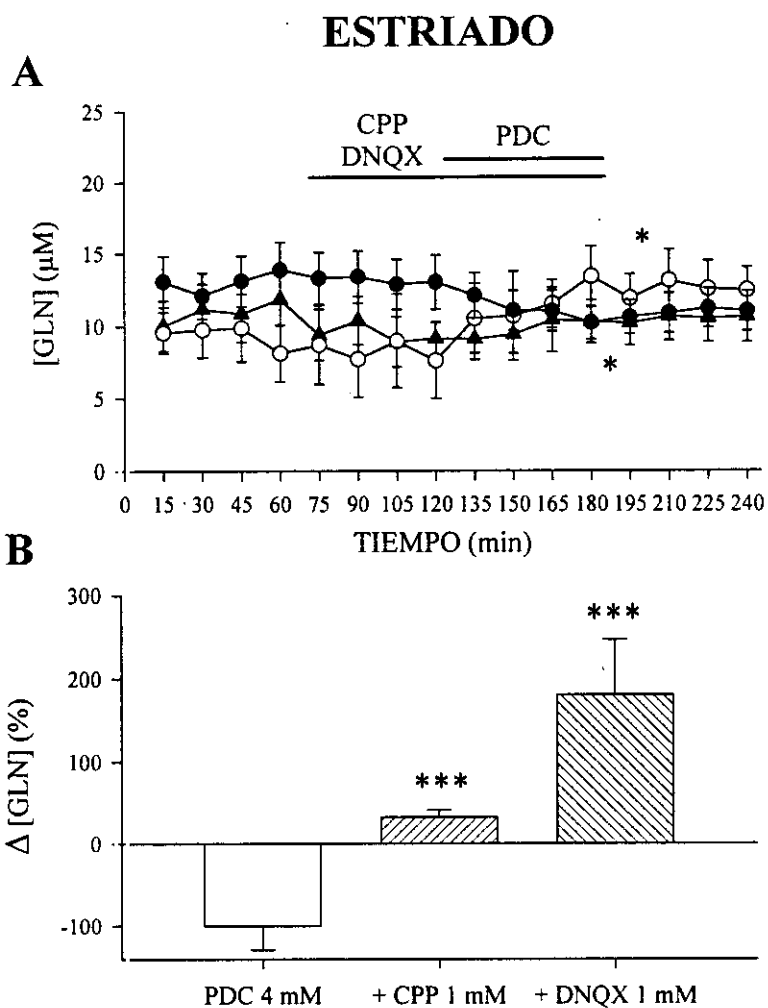
La perfusión intraestriatal tanto de CPP (1 mM) como de DNQX (1 mM) bloqueó los descensos en la concentración de glutamina producidos por el PDC (4 mM) (Fig. 35B). En ambos grupos se invirtió, además, el efecto del PDC sobre la glutamina, produciéndose un incremento de  $0.68 \pm 0.18 \mu\text{M}$  (n.s.) para el caso del CPP, y de  $3.76 \pm 1.37 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para el caso del DNQX (Fig. 35A).

#### Núcleo accumbens

La perfusión en el núcleo accumbens de CPP (1 mM) no modificó la concentración extracelular basal de glutamina (Fig. 36A). Sin embargo, la perfusión de DNQX produjo un incremento de la concentración basal de glutamina de  $1.37 \pm 0.39 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 36A).

La perfusión en el núcleo accumbens tanto de CPP (1 mM) como de DNQX (1 mM) atenuó los descensos en la concentración de glutamina producidos por el PDC (4 mM) en un 36 % ( $p < 0.01$ ) y en un 77% ( $p < 0.01$ ), respectivamente (Fig. 36B). Los descensos medios de la concentración de glutamina producidos por el PDC en los grupos de CPP y DNQX fueron de  $1.34 \pm 0.36 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) y  $0.49 \pm 0.31$  (n.s.), respectivamente (Fig. 36A).

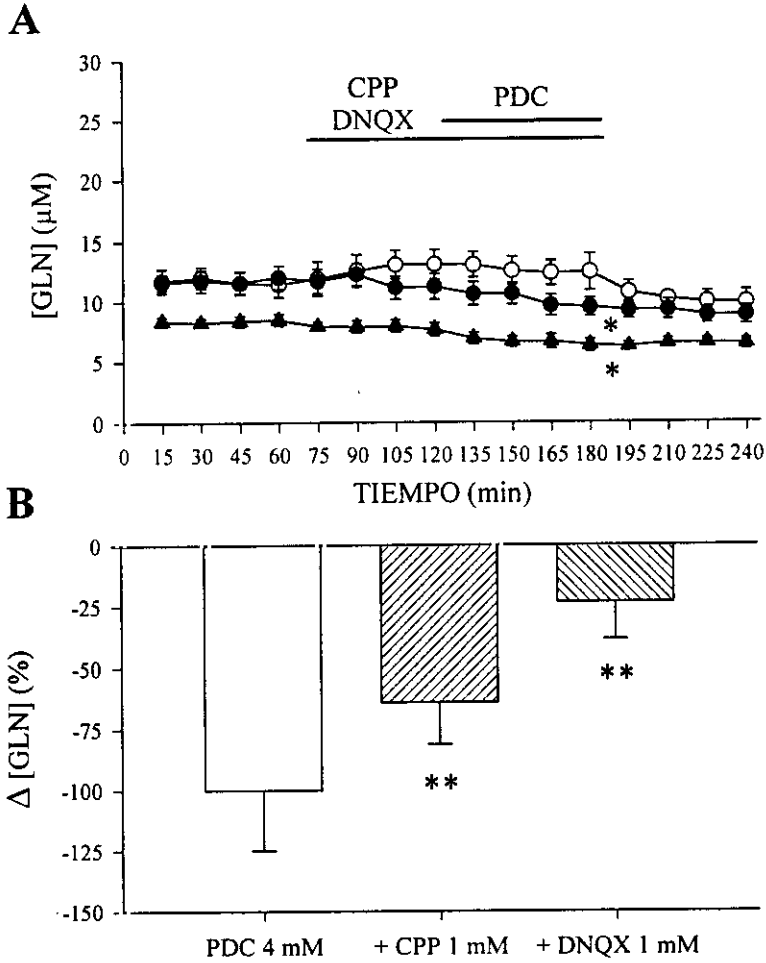




**Figura 35:** (A) Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de glutamina en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los descensos de glutamina producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*\*)  $p < 0.001$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).

Resultados

N. ACCUMBENS



**Figura 36:** (A) Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) (-●-), PDC+CPP (1 mM) (-▲-) y PDC+DNQX (1 mM) (-○-) sobre la concentración extracelular de glutamina en ratas jóvenes (2-4 meses) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) Comparación entre los descensos de glutamina producidos tras perfusión de PDC (4 mM) (100%), PDC+CPP (1 mM) o PDC+DNQX (1 mM) (\*\*  $p < 0.01$  comparado con el grupo de PDC 4 mM).

### **3. EFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE PDC EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS DE EDAD MEDIA**

#### **3.1 Glutamato**

##### Estriado

La concentración extracelular basal de glutamato en el estriado de ratas de edad media fue  $0.69 \pm 0.24 \mu\text{M}$ .

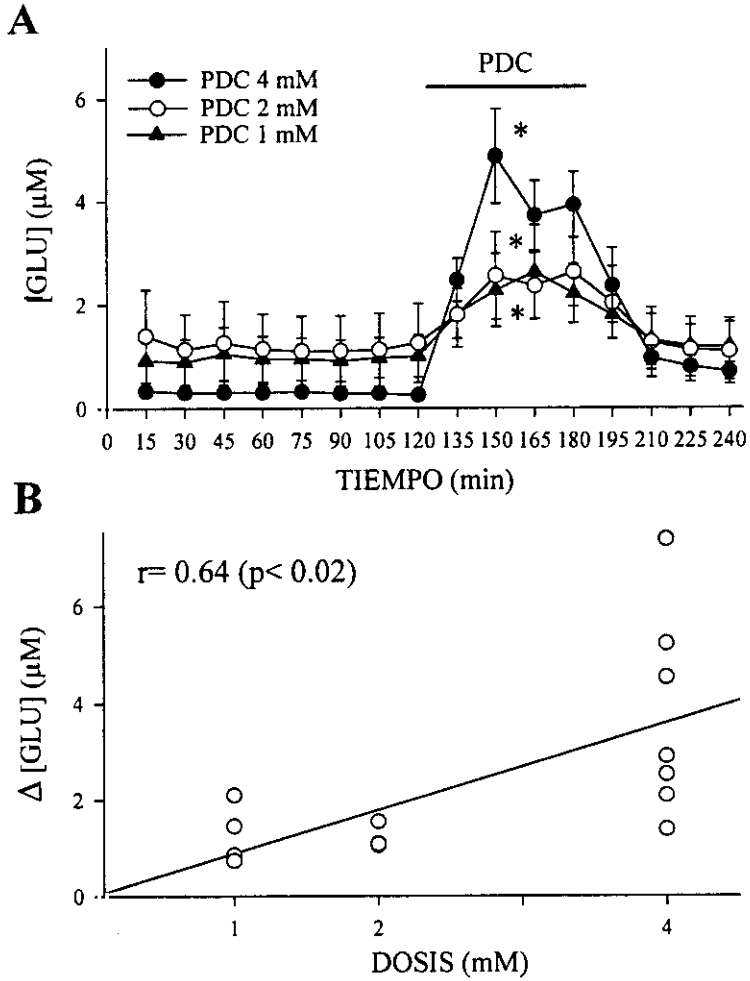
La perfusión intraestriatal de PDC (1, 2 y 4 mM) incrementó la concentración extracelular de glutamato (Fig. 37). El incremento medio de la concentración de glutamato fue:  $3.71 \pm 0.73 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $1.19 \pm 0.10 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para la dosis de 2 mM y  $1.28 \pm 0.27 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 37A). El incremento de la concentración de glutamato se correlacionó con la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.64$ ;  $p < 0.02$ ) (Fig. 37B).

##### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de glutamato en el núcleo accumbens de ratas de edad media fue  $0.39 \pm 0.06 \mu\text{M}$ .

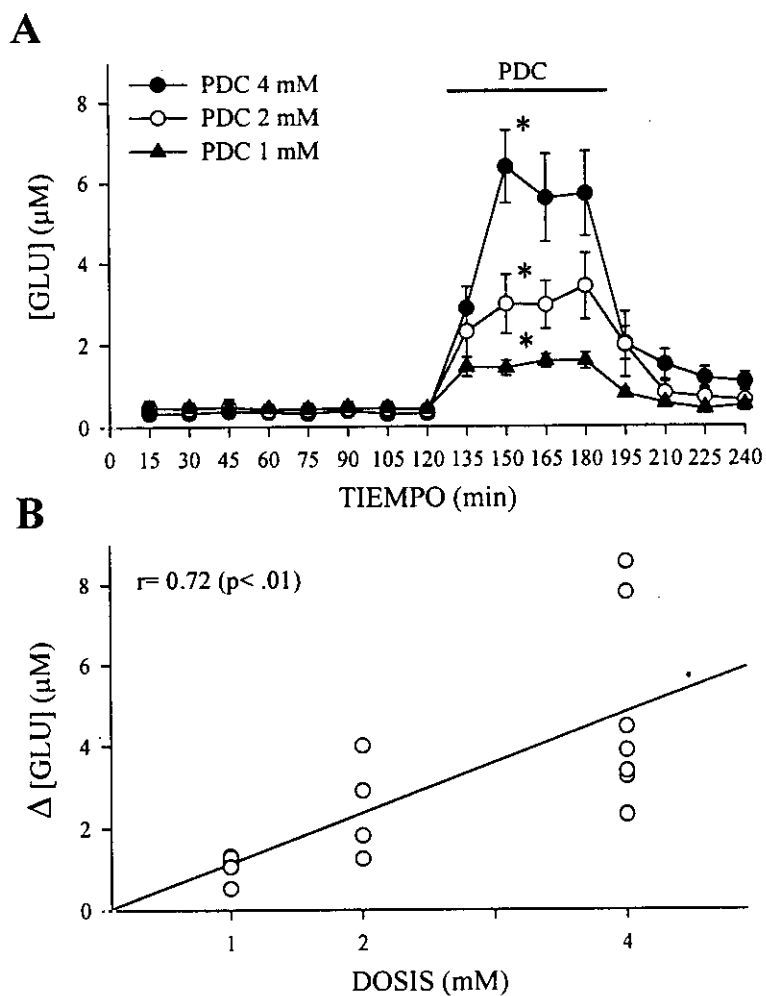
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) incrementó la concentración extracelular de glutamato (Fig. 38). El incremento medio de la concentración de glutamato fue:  $4.80 \pm 0.84 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $2.49 \pm 0.53 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para la dosis de 2 mM y  $1.07 \pm 0.13 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 38A). El incremento de la concentración de glutamato se correlacionaron significativamente con la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.72$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 38B).

## ESTRIADO



**Figura 37:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamato de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de glutamato y la dosis de PDC.

### N. ACCUMBENS



**Figura 38:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamato de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de glutamato y la dosis de PDC.

### **3.2 Dopamina y metabolitos**

#### Estriado

La concentración extracelular basal de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en el estriado de ratas de edad media fue  $1.04 \pm 0.35$  nM,  $284.27 \pm 26.53$  nM y  $101.56 \pm 12.30$  nM, respectivamente.

La perfusión PDC (4 mM) en ratas de edad media produjo un incremento de la concentración extracelular de dopamina de  $10.66 \pm 4.53$  nM ( $p < 0.001$ ) (Fig. 39A). PDC, a la dosis de 2 mM, produjo un incremento no significativo de la concentración de dopamina de  $1.21 \pm 0.34$  nM (Fig. 39A). Las dosis de 1 mM de PDC no modificó significativamente la concentración de dopamina (Fig. 39A). Al igual que en el estriado de ratas jóvenes, los incrementos de dopamina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.83$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 39B), sugiriendo que los incrementos de dopamina han sido producidos por el glutamato. El coeficiente de correlación parcial mostró que la correlación entre los incrementos de dopamina y de glutamato en ratas de edad media fue independiente de la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.77$ ;  $p < 0.01$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.62$  ( $p < 0.001$ )].

La perfusión en el estriado de PDC (4 mM) disminuyó la concentración extracelular de DOPAC y HVA (Fig. 40 y 41). El descenso medio de la concentración de DOPAC y HVA fue de  $73.34 \pm 19.51$  nM ( $p < 0.001$ ) y  $29.85 \pm 9.01$  nM ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 40A y 41A). El PDC a las dosis de 1 y 2 mM no modificó significativamente la concentración de DOPAC y HVA (Fig. 40A y 41A). Los descensos de DOPAC y HVA se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato. (Fig. 40B y 41B), sugiriendo que estos descensos han sido producidos por el glutamato. Los coeficientes de correlación parcial entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato independiente de la dosis de PDC fueron  $r = 0.56$  ( $p < 0.05$ ) para el DOPAC y  $r = 0.74$  ( $p < 0.01$ ) para el HVA. [NOTA: los coeficientes de correlación parcial obtenidos a partir de todos los datos en el estudio fueron  $r = 0.40$  ( $p < 0.001$ ) para el DOPAC, y  $r = 0.40$  ( $p < 0.001$ ) para el HVA].

#### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en el núcleo accumbens de ratas de edad media fue  $0.39 \pm 0.06$  nM,  $275.35 \pm 31.91$  nM y  $93.29 \pm 12.64$  nM, respectivamente.

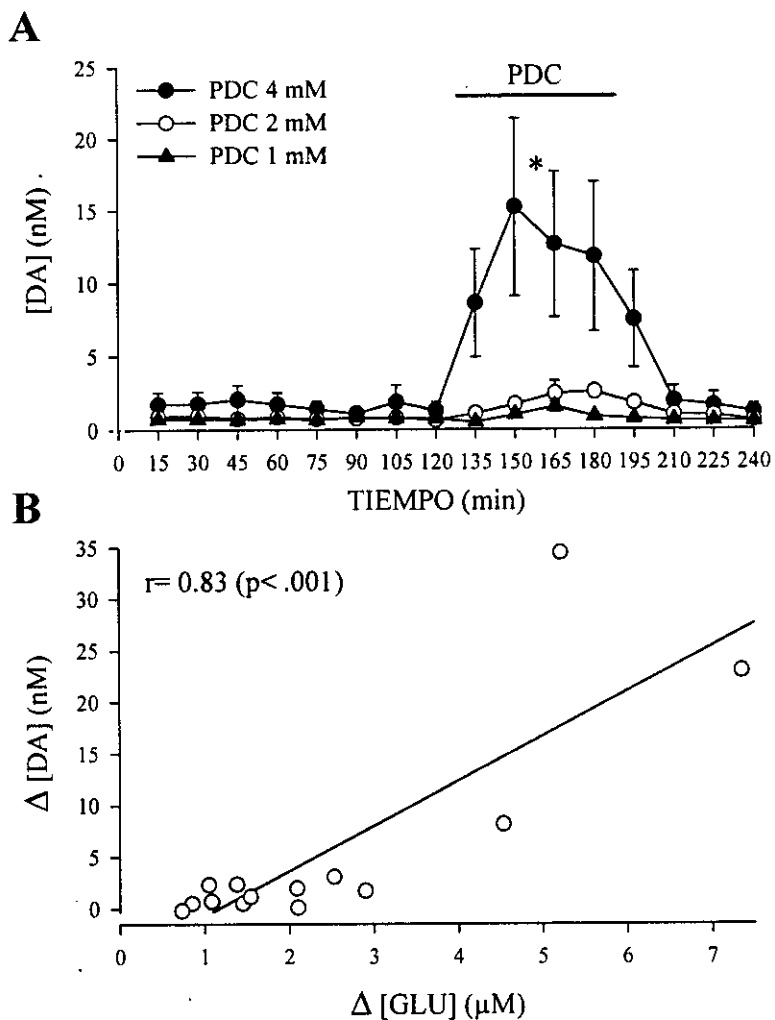
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (2 y 4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de dopamina de  $3.50 \pm 0.94$  nM ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM y de  $1.19 \pm 0.32$  nM ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 2 mM (Fig. 42A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó la concentración extracelular de

## *Resultados*

dopamina (Fig. 42A). Los incrementos de dopamina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r= 0.87$ ;  $p< 0.001$ ) (Fig. 42B), lo cual sugiere que los incrementos de dopamina han sido producidos por el glutamato. El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de dopamina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r= 0.77$  ( $p< 0.01$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenida a partir de todos los datos en el estudio fue  $r= 0.54$  ( $p< 0.001$ )].

La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (2 y 4 mM) disminuyó la concentración extracelular de DOPAC y HVA (Fig. 43 y 44). Para la dosis de 4 mM, el descenso medio de la concentración de DOPAC y HVA fue de  $84.22\pm 18.06$  nM ( $p< 0.001$ ) y  $30.50\pm 7.34$  nM ( $p< 0.001$ ) respectivamente (Fig. 43A y 44A). El PDC a la dosis de 2 mM produjo un descenso en la concentración de DOPAC y HVA de  $51.22\pm 6.08$  nM ( $p< 0.05$ ) y  $14.83\pm 3.63$  nM ( $p< 0.05$ ), respectivamente (Fig. 43A y 44A). Los descensos de DOPAC y HVA se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato. (Fig. 43B y 44B). Los coeficientes de correlación parcial entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato fueron  $r= 0.69$  ( $p< 0.01$ ) para el DOPAC y  $r= 0.57$  ( $p< 0.05$ ) para el HVA, indicando que la correlación entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato en ratas de edad media fue independiente de la dosis de PDC. [NOTA: las correlaciones parciales obtenidas a partir de todos los datos en el estudio fueron  $r= 0.45$  ( $p< 0.01$ ) para el DOPAC, y  $r= 0.45$  ( $p< 0.001$ ) para el HVA].

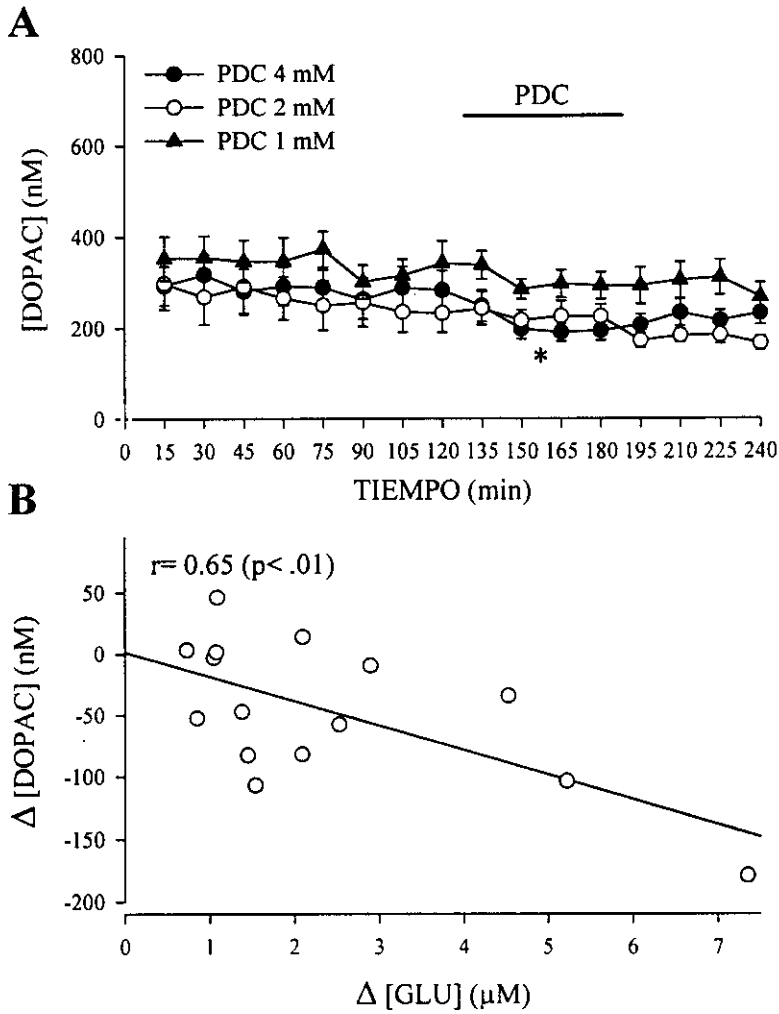
## ESTRIADO



**Figura 39:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de dopamina de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato.

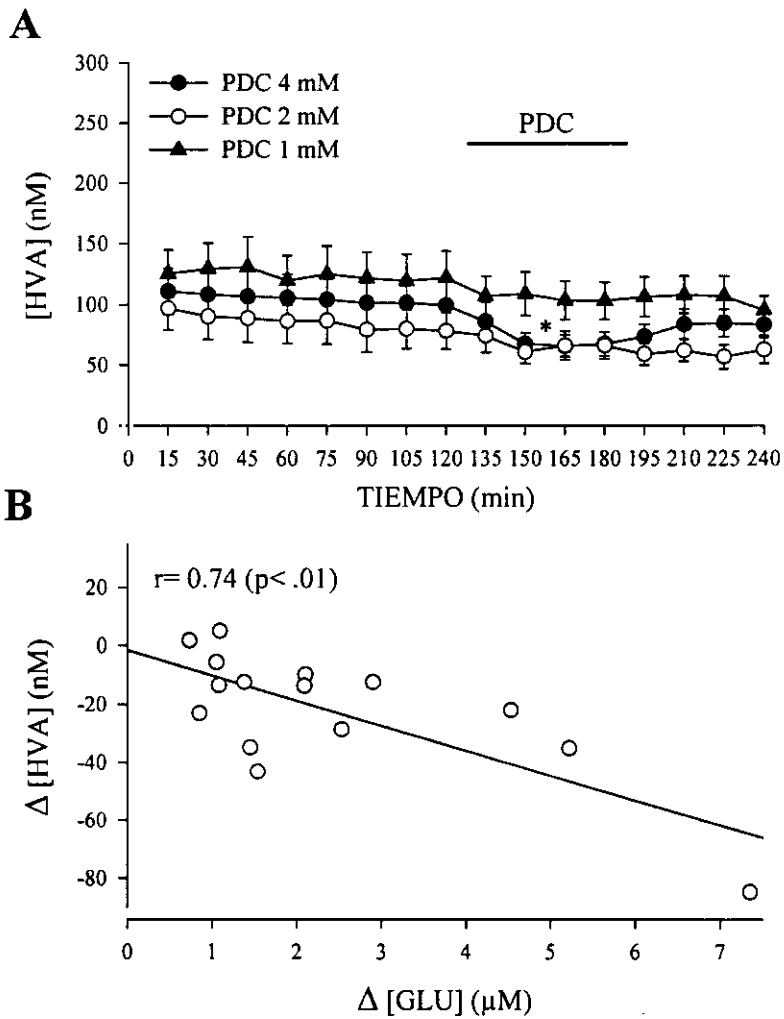


## ESTRIADO



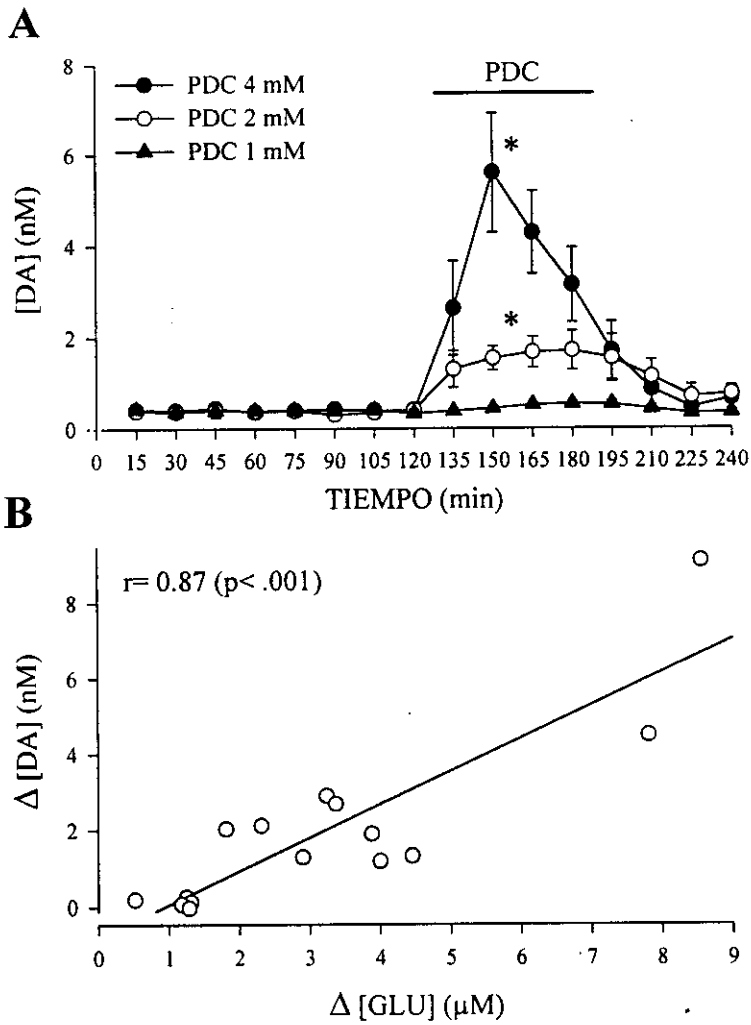
**Figura 40:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de DOPAC de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de DOPAC y los incrementos de glutamato.

**ESTRIADO**



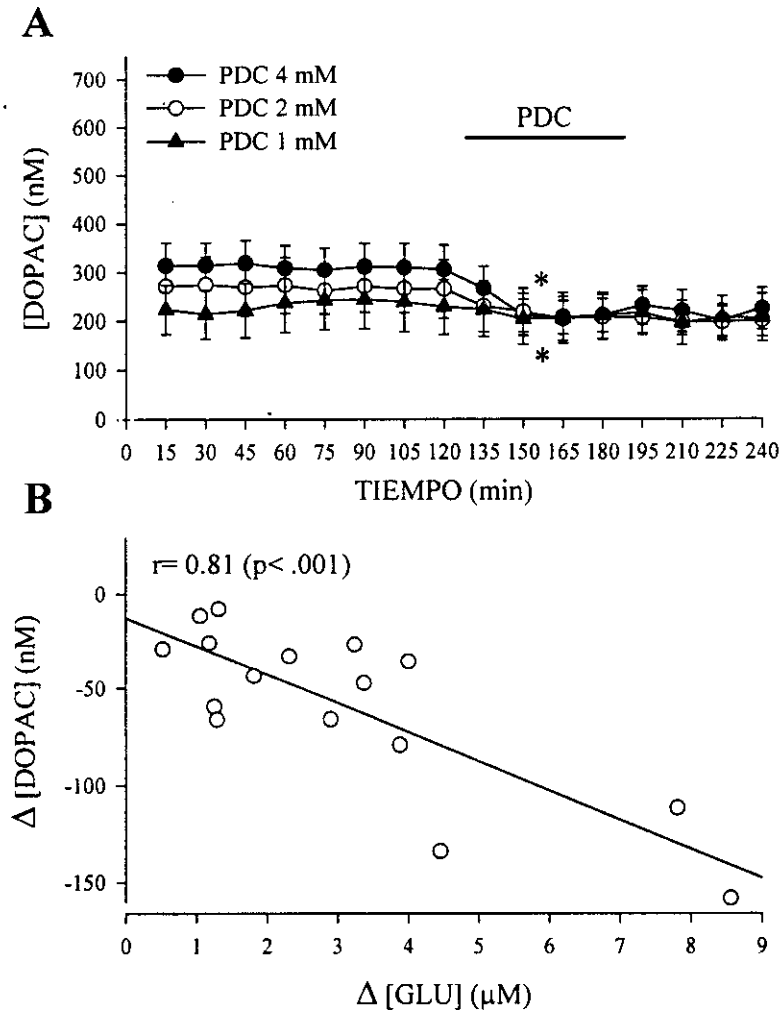
**Figura 41:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de HVA de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato.

**N. ACCUMBENS**



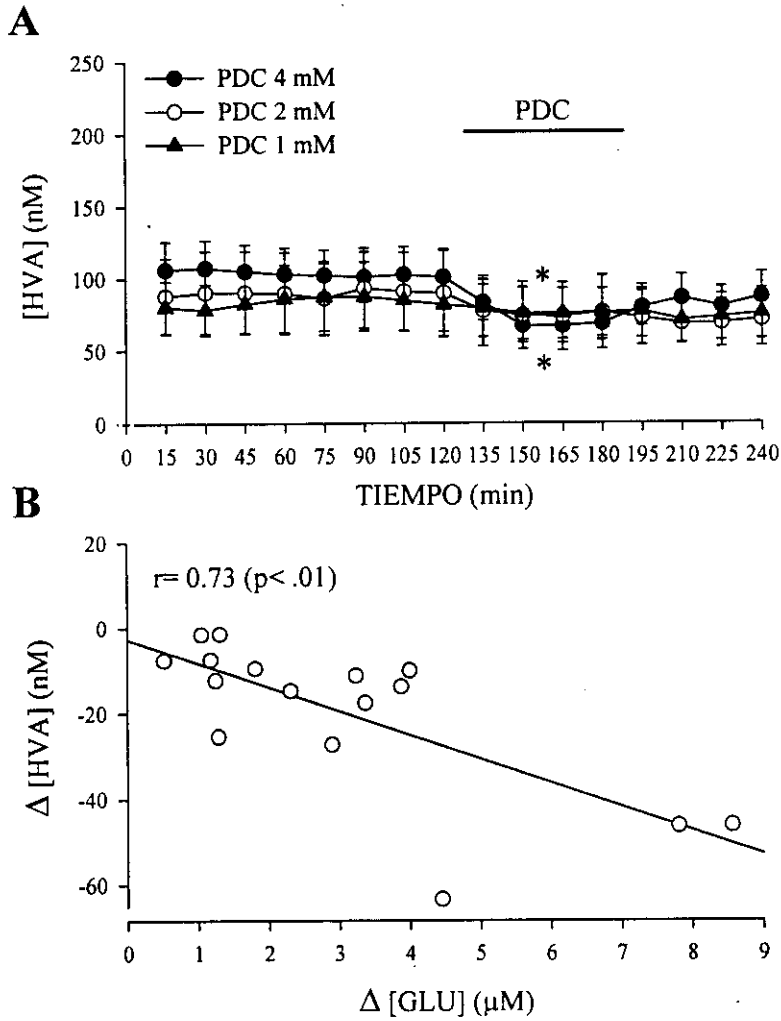
**Figura 42:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de dopamina de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato.

## N. ACCUMBENS



**Figura 43:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de DOPAC de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de DOPAC y los incrementos de glutamato.

**N. ACCUMBENS**



**Figura 44:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de HVA de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato.

### **3.3 GABA**

#### Estriado

La concentración extracelular basal de GABA en el estriado de ratas de edad media fue  $0.11 \pm 0.01 \mu\text{M}$ .

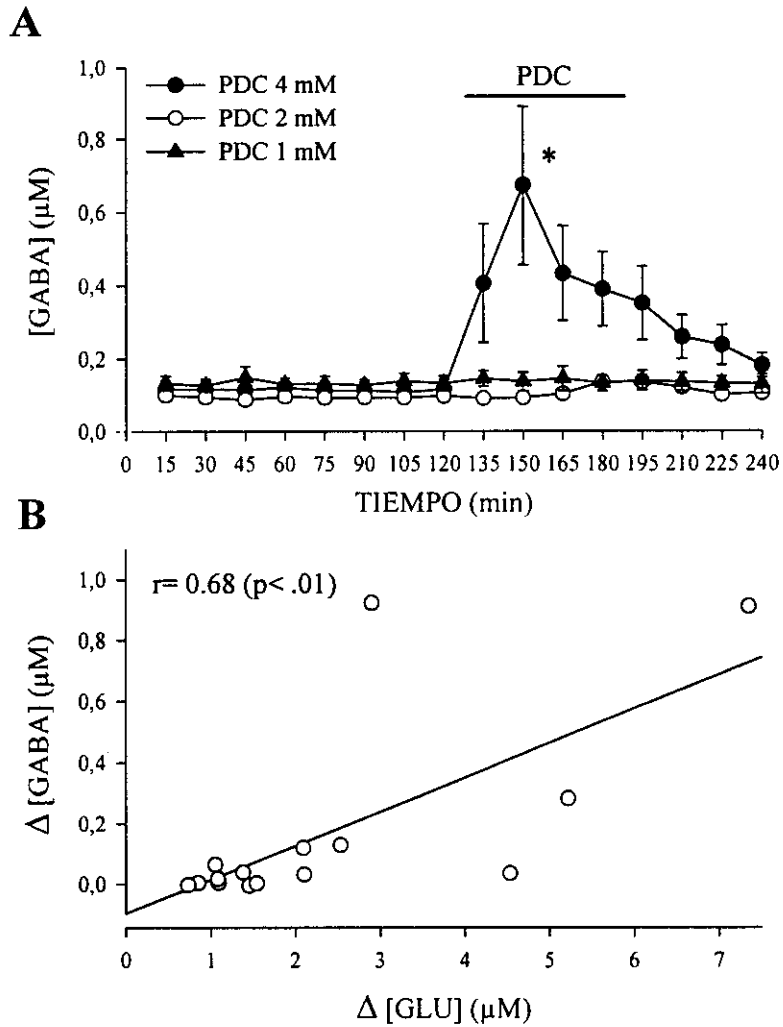
La perfusión intraestriatal de PDC (4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de GABA de  $0.35 \pm 0.14 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 45A). PDC a la dosis de 2 mM produjo un incremento no significativo, retrasado en el tiempo, de  $0.04 \pm 0.02 \mu\text{M}$  (Fig. 45A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó significativamente la concentración de GABA (Fig. 45A). Los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato se correlacionaron significativamente ( $r = 0.68$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 45B), sugiriendo que los incrementos de GABA han sido producidos por el glutamato. El análisis estadístico posterior a través del cálculo del coeficiente de correlación parcial mostró que la correlación entre los incrementos de GABA y de glutamato en ratas de edad media fue independiente de la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.52$ ;  $p < 0.05$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.70$  ( $p < 0.001$ )].

#### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de GABA en el núcleo accumbens de ratas de edad media fue  $0.11 \pm 0.01 \mu\text{M}$ .

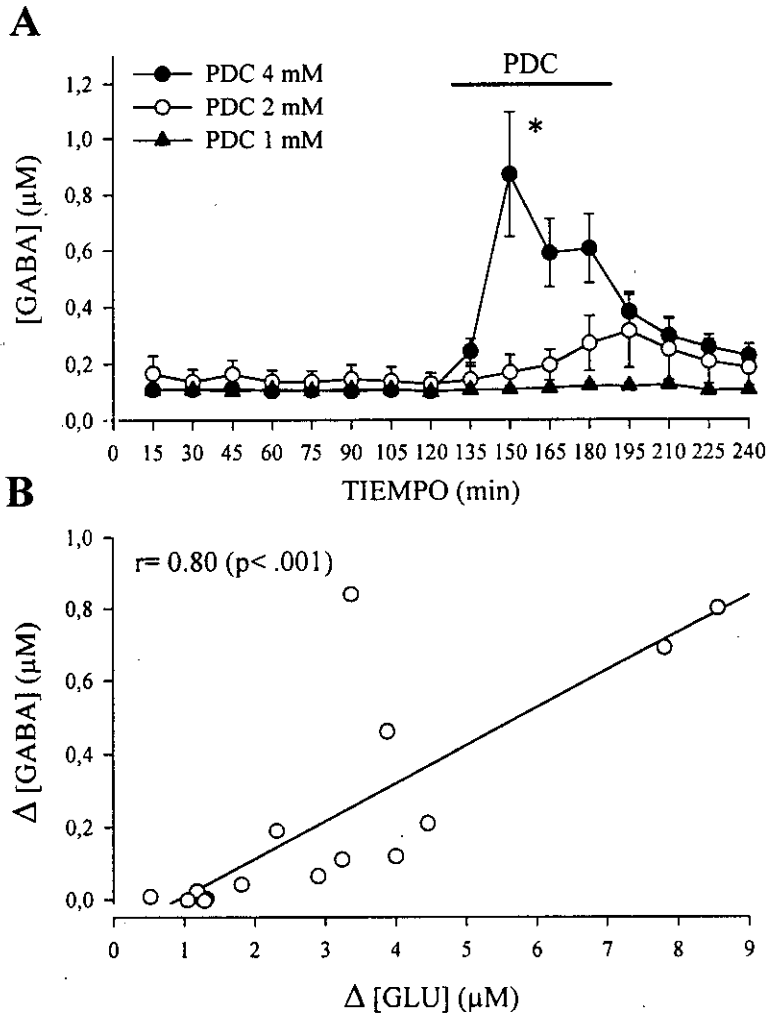
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de GABA de  $0.47 \pm 0.11 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 46A). Al igual que en el estriado, PDC a las dosis de 2 mM produjo un incremento no significativo retrasado en el tiempo en la concentración de GABA de  $0.12 \pm 0.06 \mu\text{M}$  (Fig. 46A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó significativamente la concentración de GABA (Fig. 46A). Como se ve en la Figura 46B los incrementos de GABA se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.80$ ;  $p < 0.001$ ). El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de GABA y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada en ratas jóvenes fue  $r = 0.77$  ( $p < 0.01$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.54$  ( $p < 0.001$ )].

## ESTRIADO



**Figura 45:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de GABA de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato.

### N. ACCUMBENS



**Figura 46:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de GABA de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato.



### 3.4 Taurina

#### Estriado

La concentración extracelular basal de taurina en el estriado de ratas de edad media fue  $1.06 \pm 0.15 \mu\text{M}$ .

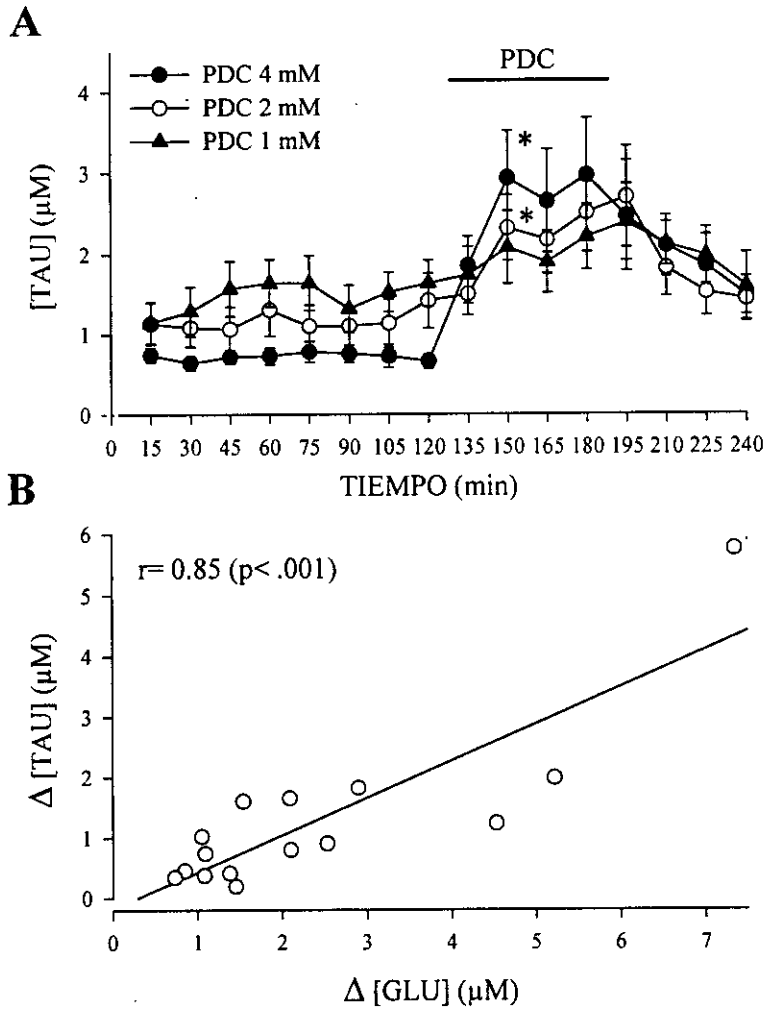
La perfusión en el estriado de PDC (2 y 4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de taurina (Fig. 47A). Los incrementos medios de la concentración de taurina fueron:  $1.96 \pm 0.61 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM, y  $0.93 \pm 0.22 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 2 mM (Fig. 47A). PDC, a la dosis de 1 mM, produjo un incremento no significativo de la concentración de taurina de  $0.44 \pm 0.11 \mu\text{M}$  (Fig. 47A). Los incrementos de taurina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.85$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 47B), lo cual sugiere que los incrementos de taurina han sido producidos por el glutamato. El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de taurina y de glutamato independiente de la dosis de PDC en ratas de edad media fue  $r = 0.80$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.83$  ( $p < 0.001$ )].

#### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de taurina en el núcleo accumbens de ratas de edad media fue  $0.88 \pm 0.09 \mu\text{M}$ .

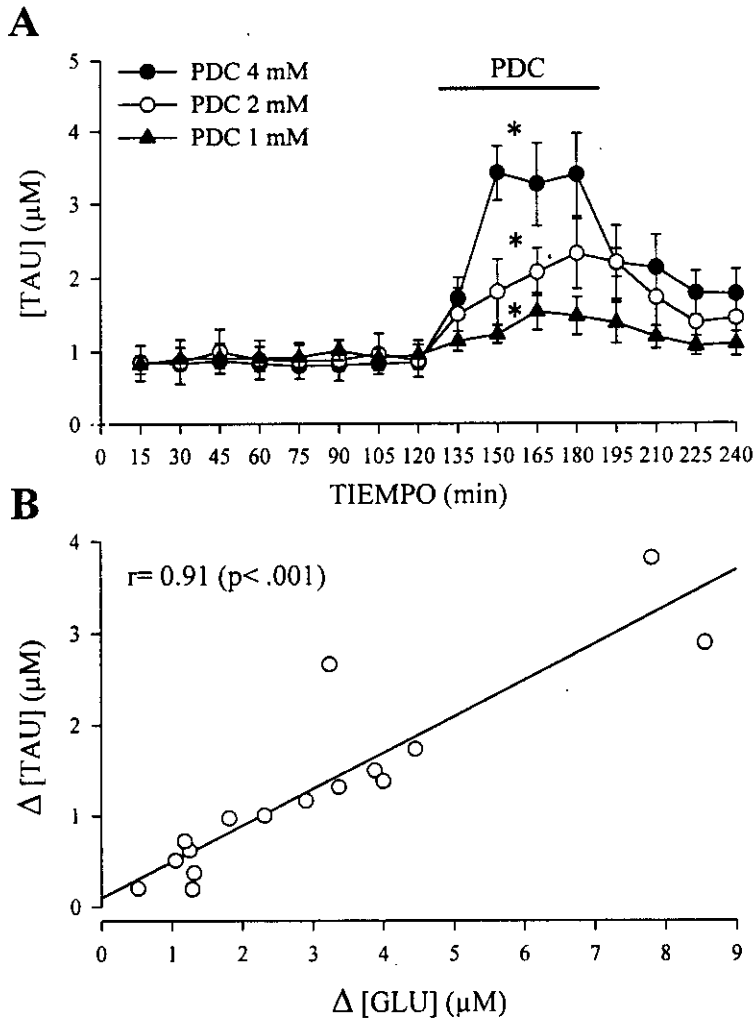
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de taurina (Fig. 48A). Los incrementos medios de la concentración de taurina fueron:  $2.12 \pm 0.36 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $1.03 \pm 0.14 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para la dosis de 2 mM, y  $0.40 \pm 0.09 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 48A). Al igual que en ratas jóvenes, los incrementos de taurina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato en ratas de edad media ( $r = 0.91$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 48B). El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de taurina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.80$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.83$  ( $p < 0.001$ )].

## ESTRIADO



**Figura 47:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de taurina de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato.

**N. ACCUMBENS**



**Figura 48:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de taurina de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato.

### 3.5 Glutamina

#### Estriado

La concentración extracelular basal de glutamina en el estriado de ratas medias fue  $14.71 \pm 1.59 \mu\text{M}$ . Al contrario que en ratas jóvenes, no se encontró una correlación significativa entre los incrementos de glutamato y la glutamina basal en ratas de edad media: el coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de glutamato y la concentración basal de glutamina independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.72$  (n.s.). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.53$  ( $p < 0.001$ )].

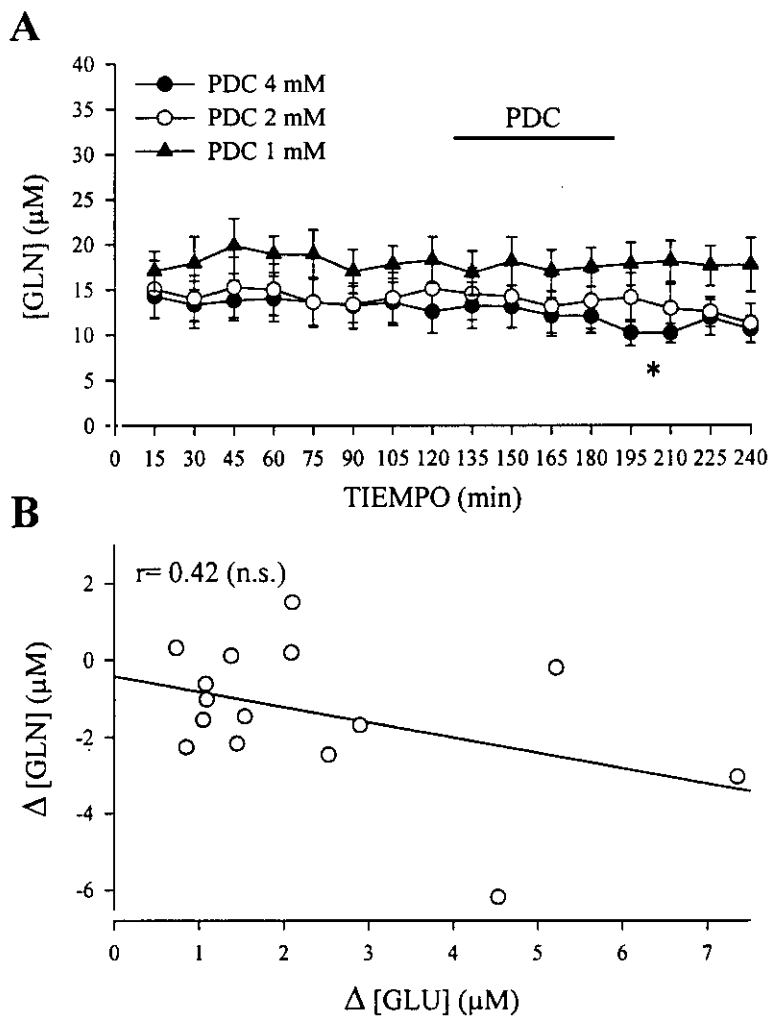
La perfusión en el estriado de PDC (4 mM) produjo un descenso de la concentración extracelular de glutamina de  $1.90 \pm 0.80 \mu\text{M}$ , que sólo alcanza la significación tras la perfusión de PDC ( $p < 0.01$ ) (Fig. 49A). PDC a las dosis de 1 y 2 mM no modificó la concentración de glutamina. Al contrario que en ratas jóvenes, los descensos de glutamina no se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.42$ ; n.s.) (Fig. 49B). El coeficiente de correlación parcial entre los descensos de glutamina y de glutamato en ratas medias independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.31$  (n.s.). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.48$  ( $p < 0.001$ )].

#### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de glutamina en el núcleo accumbens de ratas de edad media fue  $18.76 \pm 0.93 \mu\text{M}$ . Al contrario que en el estriado, los incrementos de glutamato se correlacionaron con la concentración basal de glutamina: el coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de glutamato y la concentración basal de glutamina independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.52$  ( $p < 0.05$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.33$  ( $p < 0.02$ )].

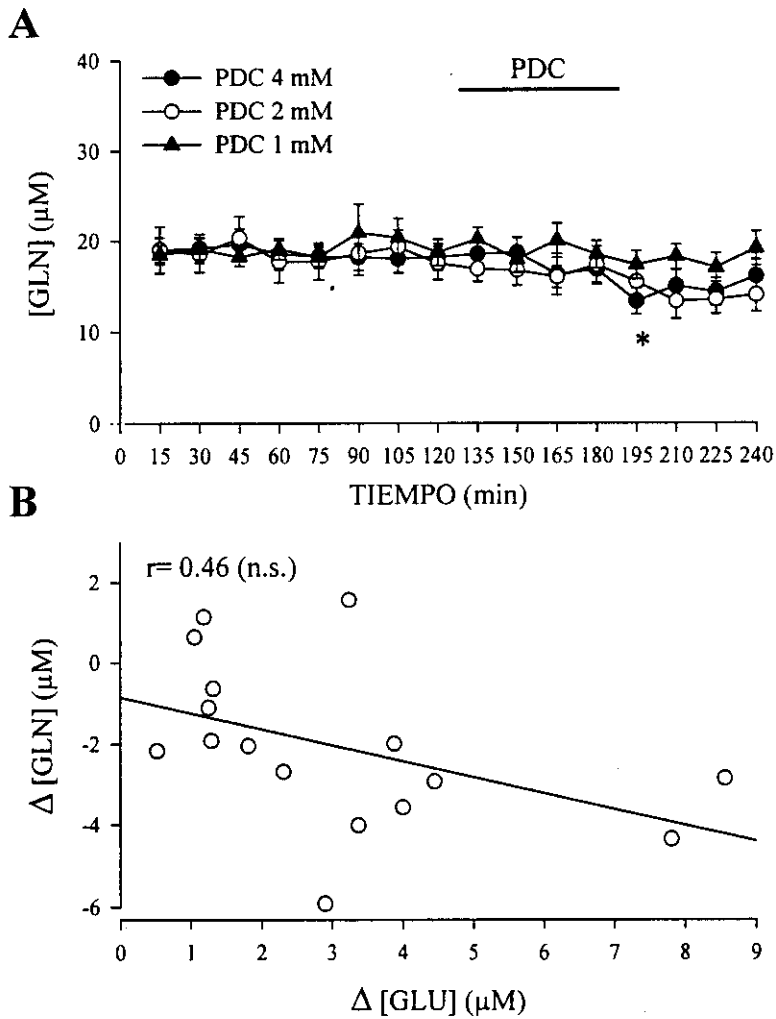
La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) produjo un descenso de la concentración extracelular de glutamina de  $2.47 \pm 0.52 \mu\text{M}$ , que sólo alcanzó significación estadística tras la perfusión del PDC ( $p < 0.01$ ) (Fig. 50A). PDC a las dosis de 1 y 2 mM no modificó significativamente la concentración de glutamina (Fig. 50A). Como en el estriado, los descensos de glutamina no se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.46$ ; n.s.) (Fig. 50B). El coeficiente de correlación parcial entre los descensos de glutamina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.35$  (n.s.). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.23$  (n.s.)].

## ESTRIADO



**Figura 49:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamina de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato.

### N. ACCUMBENS



**Figura 50:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamina de ratas de edad media (12-14 meses) (A) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (B) correlación entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato.

#### **4. EFECTO DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE PDC EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS DE EDAD VIEJA Y MUY VIEJA**

##### **4.1 Glutamato**

###### Estriado

La concentración extracelular basal de glutamato en el estriado de ratas de edad vieja y muy vieja fue  $0.44 \pm 0.09 \mu\text{M}$  y  $0.73 \pm 0.20 \mu\text{M}$ , respectivamente.

La perfusión intraestriatal de PDC (1, 2 y 4 mM) en ratas de edad vieja incrementó la concentración extracelular de glutamato (Fig. 51A). El incremento medio de la concentración de glutamato fue:  $2.89 \pm 0.60 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $1.23 \pm 0.13 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para la dosis de 2 mM y  $0.82 \pm 0.14 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 51A). La perfusión en el estriado de PDC (4 mM) en ratas de edad muy vieja produjo un incremento significativo de la concentración de glutamato de  $3.11 \pm 0.46 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 51B). El incremento de la concentración de glutamato en ratas viejas y muy viejas se correlacionó con la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.64$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 51C).

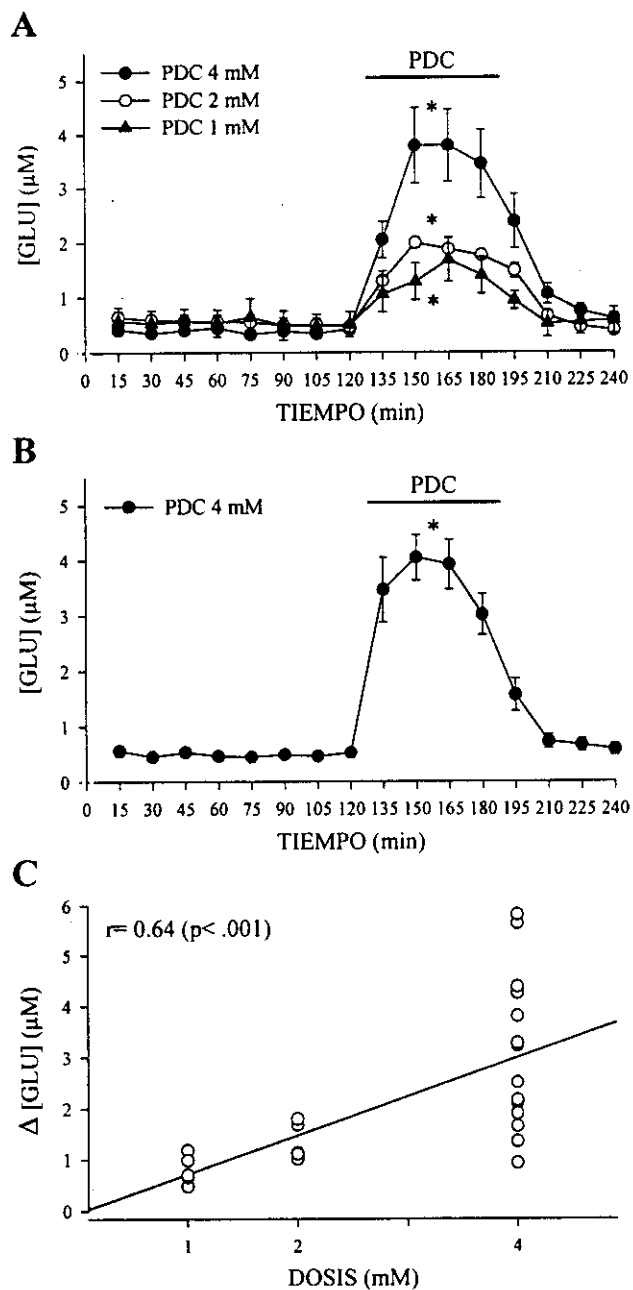
###### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de glutamato en el núcleo accumbens de ratas de edad vieja y muy vieja fue  $0.36 \pm 0.04 \mu\text{M}$  y  $0.29 \pm 0.05 \mu\text{M}$ , respectivamente.

La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) en ratas de edad vieja incrementó la concentración extracelular de glutamato (Fig. 52A). El incremento medio de la concentración de glutamato fue:  $5 \pm 1.05 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $1.51 \pm 0.19 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) para la dosis de 2 mM y  $1.06 \pm 0.11 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 52A). La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) en ratas de edad muy vieja produjo un incremento significativo de la concentración de glutamato de  $3.24 \pm 0.43 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 52B). El incremento de la concentración de glutamato en ratas viejas y muy viejas se correlacionó significativamente con la dosis de PDC utilizada ( $r = 0.68$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 52C).

## Resultados

### ESTRIADO

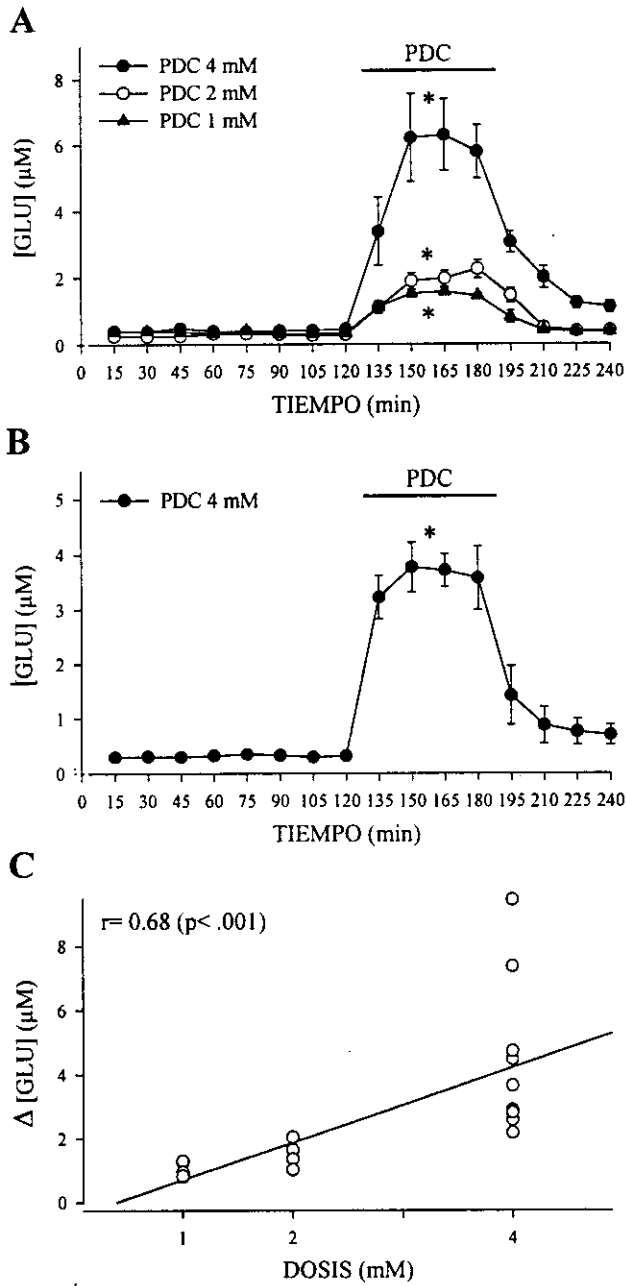


**Figura 51:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamato de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los incrementos de glutamato y la dosis de PDC.



Resultados

N. ACCUMBENS



**Figura 52:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamato de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los incrementos de glutamato y la dosis de PDC.

## 4.2 Dopamina y metabolitos

### Estriado

La concentración extracelular basal de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en el estriado de ratas de edad vieja fue  $1.20 \pm 0.21$  nM,  $234.34 \pm 33.34$  nM y  $106.11 \pm 14.96$  nM, respectivamente. En cuanto a la concentración extracelular basal de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en el estriado de ratas de edad muy vieja, ésta fue  $0.90 \pm 0.11$  nM,  $426.48 \pm 56.89$  nM y  $106.45 \pm 12.62$  nM, respectivamente.

La perfusión PDC (4 mM) en ratas de edad vieja produjo un incremento de la concentración extracelular de dopamina de  $3.13 \pm 0.74$  nM ( $p < 0.001$ ) (Fig. 53A). PDC, a la dosis de 2 mM, produjo un incremento no significativo de la concentración de dopamina de  $0.82 \pm 0.60$  nM (Fig. 53A). Las dosis de 1 mM de PDC no modificó significativamente la concentración de dopamina (Fig. 53A). Por otro lado, la perfusión PDC (4 mM) en ratas de edad muy vieja produjo un incremento de la concentración extracelular de dopamina de  $4.09 \pm 1.50$  nM ( $p < 0.001$ ) (Fig. 53B). Al igual que en el estriado de ratas jóvenes, los incrementos de dopamina en ratas viejas y muy viejas se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.66$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 53C). El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de dopamina y de glutamato en ratas de edad vieja y muy vieja independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.56$  ( $p < 0.01$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.62$  ( $p < 0.001$ )].

La perfusión en el estriado de PDC (4 mM) en ratas viejas disminuyó la concentración extracelular de DOPAC y HVA (Fig. 54A y 55A). El descenso medio de la concentración de DOPAC y HVA fue de  $54.30 \pm 17.90$  nM ( $p < 0.01$ ) y  $29.55 \pm 8.91$  nM ( $p < 0.001$ ), respectivamente (Fig. 54A y 55A). El PDC a las dosis de 2 mM también produjo un descenso de la concentración de DOPAC y HVA de  $34.60 \pm 23.02$  nM (n.s.) y  $18.10 \pm 11.39$  nM ( $p < 0.05$ ) (Fig. 54A y 55A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó la concentración extracelular de DOPAC y HVA (Fig. 54A y 55A). La perfusión de PDC (4 mM) en el estriado de ratas muy viejas produjo un descenso de la concentración de DOPAC y HVA de  $80.12 \pm 23.09$  nM ( $p < 0.001$ ) y  $23.27 \pm 4.26$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 54B y 55B). Los descensos de DOPAC y HVA en ratas viejas y muy viejas se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato (Fig. 54C y 55C), sugiriendo que estos descensos han sido producidos por el glutamato. Los coeficientes de correlación parcial entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato independiente de la dosis de PDC fueron  $r = 0.37$  (n.s.) para el DOPAC y  $r = 0.44$  ( $p < 0.05$ ) para el HVA. [NOTA: los coeficientes de correlación parcial obtenidos a partir de todos los datos en el estudio fueron  $r = 0.40$  ( $p < 0.001$ ) para el DOPAC, y  $r = 0.40$  ( $p < 0.001$ ) para el HVA].

## Resultados

### Núcleo accumbens

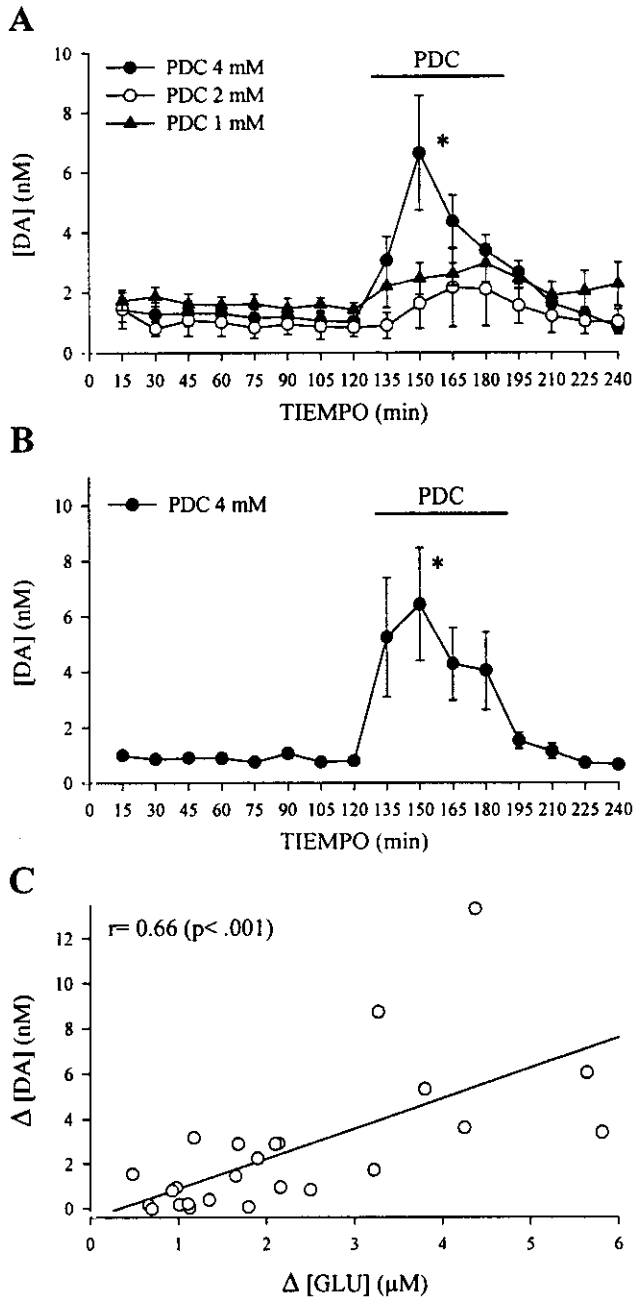
La concentración extracelular basal de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en el núcleo accumbens de ratas de edad vieja fue  $0.47 \pm 0.06$  nM,  $234.95 \pm 38.16$  nM y  $56.80 \pm 8.12$  nM, respectivamente. La concentración extracelular basal de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en ratas de edad muy vieja fue  $0.40 \pm 0.05$  nM,  $271.54 \pm 47.30$  nM y  $47.08 \pm 7.89$  nM, respectivamente.

La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de dopamina de  $2.93 \pm 1.17$  nM ( $p < 0.001$ ) (Fig. 56A). La dosis de 2 mM produjo un incremento no significativo de la concentración de dopamina de  $0.92 \pm 0.22$  nM (Fig. 56A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó la concentración extracelular de dopamina (Fig. 56A). La perfusión de PDC (4 mM) en el núcleo accumbens de ratas muy viejas produjo un incremento de la concentración de dopamina de  $1.52 \pm 0.24$  nM ( $p < 0.001$ ) (Fig. 56B). Los incrementos de dopamina en ratas viejas y muy viejas se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.89$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 56C), lo cual sugiere que los incrementos de dopamina han sido producidos por el glutamato. El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de dopamina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.87$  ( $p < 0.01$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenida a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.54$  ( $p < 0.001$ )].

La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) produjo un descenso de la concentración extracelular de DOPAC y HVA de  $58.71 \pm 35.73$  nM ( $p < 0.01$ ) y  $15.57 \pm 7.57$  nM ( $p < 0.01$ ), respectivamente (Fig. 57A y 58A). El PDC a la dosis de 2 mM produjo un descenso no significativo en la concentración de DOPAC, pero no de HVA, de  $37.59 \pm 14.84$  nM (Fig. 57A y 58A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó la concentración de DOPAC ni de HVA (Fig. 57A y 58A). La perfusión de PDC (4 mM) en el núcleo accumbens de ratas muy viejas produjo un descenso de la concentración extracelular de DOPAC y HVA de  $75.32 \pm 23.45$  nM ( $p < 0.01$ ) y  $17.20 \pm 4.06$  nM ( $p < 0.01$ ), respectivamente (Fig. 57B y 58B). Los descensos de DOPAC y HVA se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato (Fig. 57C y 58C). Los coeficientes de correlación parcial entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato independiente de la dosis de PDC fueron  $r = 0.52$  ( $p < 0.05$ ) para el DOPAC y  $r = 0.60$  ( $p < 0.01$ ) para el HVA. [NOTA: las correlaciones parciales obtenidas a partir de todos los datos en el estudio fueron  $r = 0.45$  ( $p < 0.01$ ) para el DOPAC, y  $r = 0.45$  ( $p < 0.001$ ) para el HVA].

Resultados

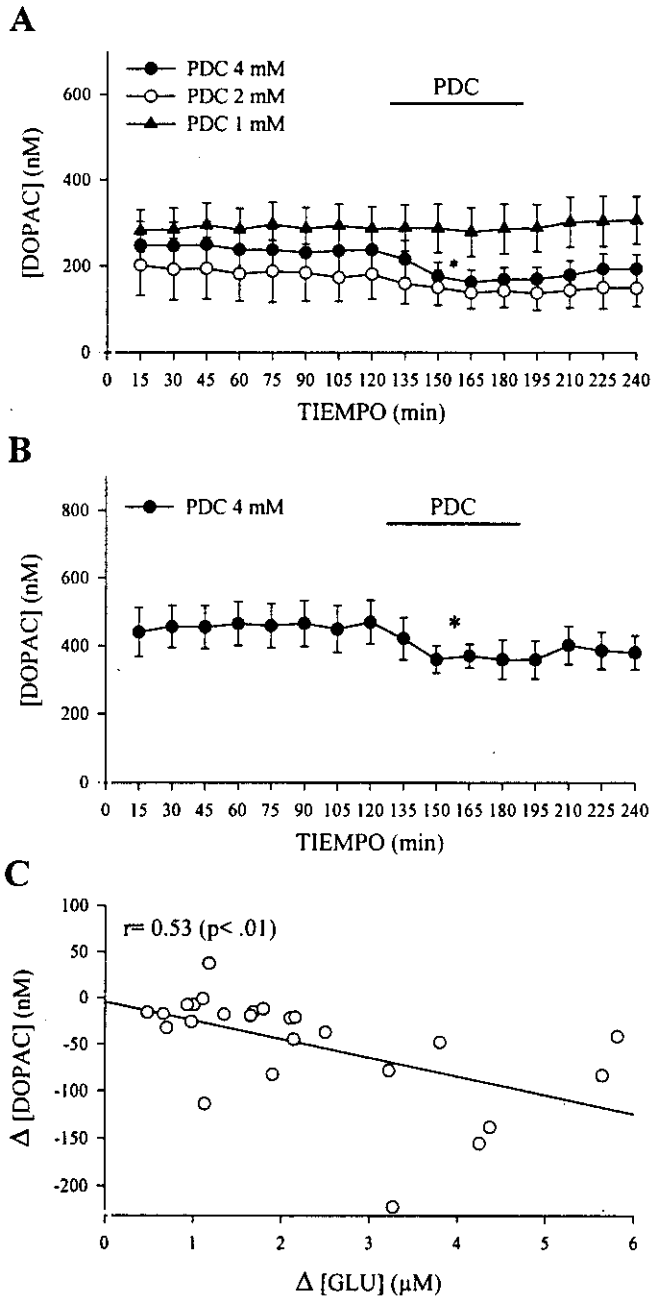
ESTRIADO



**Figura 53:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de dopamina de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato.

Resultados

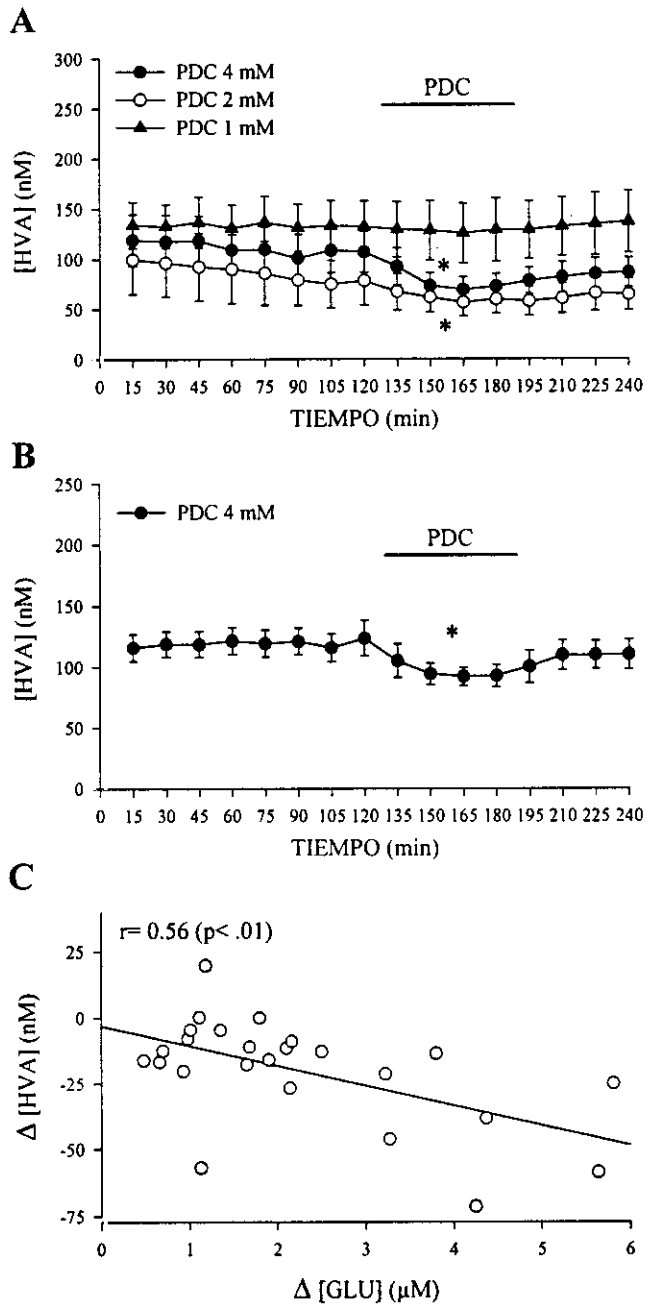
ESTRIADO



**Figura 54:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de DOPAC de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato.

## Resultados

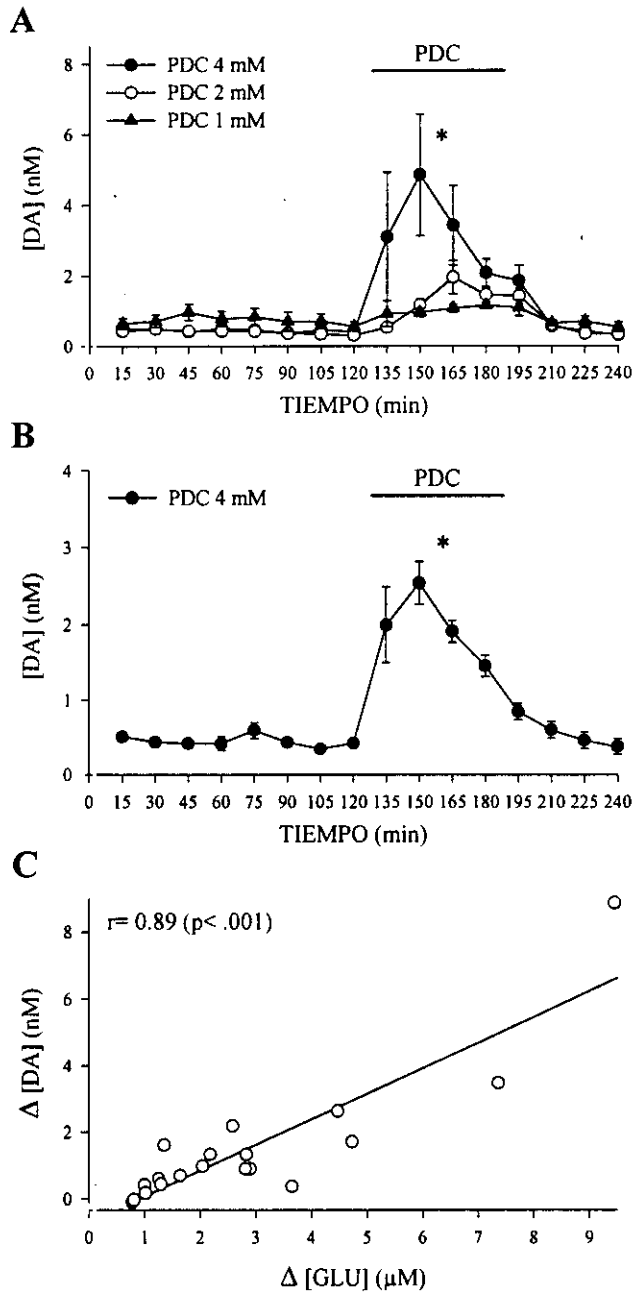
### ESTRIADO



**Figura 55:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de HVA de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato.

## Resultados

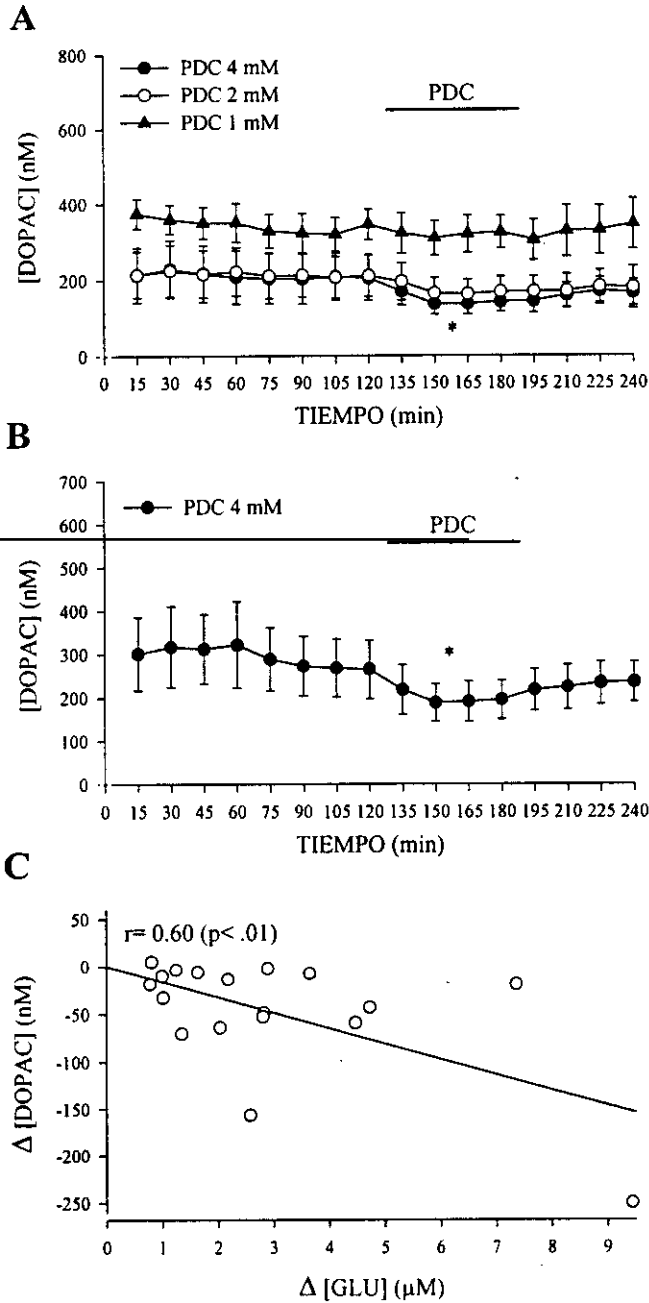
### N. ACCUMBENS



**Figura 56:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de dopamina de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato.

Resultados

N. ACCUMBENS

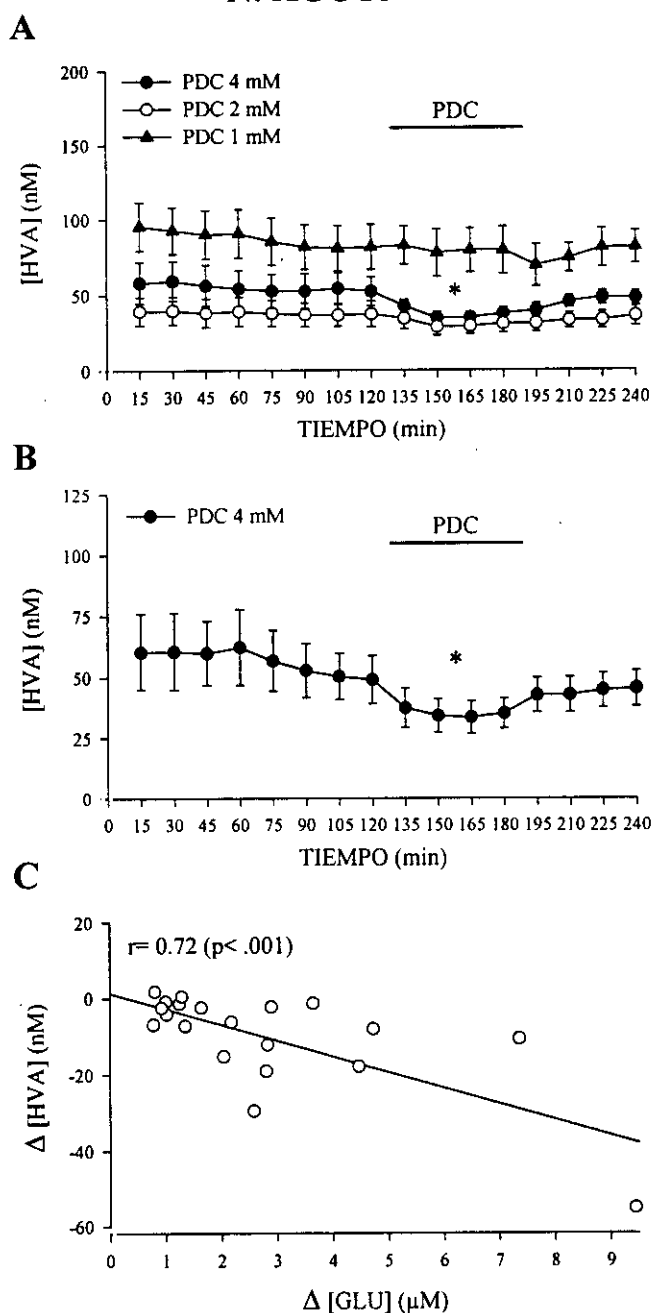


**Figura 57:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de DOPAC de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los descensos de DOPAC y los incrementos de glutamato.



## Resultados

### N. ACCUMBENS



**Figura 58:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de HVA de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato.

### 4.3 GABA

#### Estriado

La concentración extracelular basal de GABA en el estriado de ratas de edad vieja y muy vieja fue  $0.10 \pm 0.01 \mu\text{M}$  y  $0.09 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , respectivamente.

La perfusión de PDC (4 mM) en el estriado de ratas viejas produjo un incremento de la concentración extracelular de GABA de  $0.22 \pm 0.04 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 59A). PDC a la dosis de 2 mM produjo un incremento no significativo, retrasado en el tiempo, de  $0.04 \pm 0.02 \mu\text{M}$  (Fig. 59A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó significativamente la concentración de GABA (Fig. 59A). La intraestriatal de PDC (4 mM) en ratas muy viejas produjo un incremento de la concentración extracelular de GABA de  $0.18 \pm 0.03 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 59B). Los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato en ratas viejas y muy viejas se correlacionaron significativamente ( $r = 0.66$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 59C). El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de GABA y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.60$  ( $p < 0.01$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.70$  ( $p < 0.001$ )].

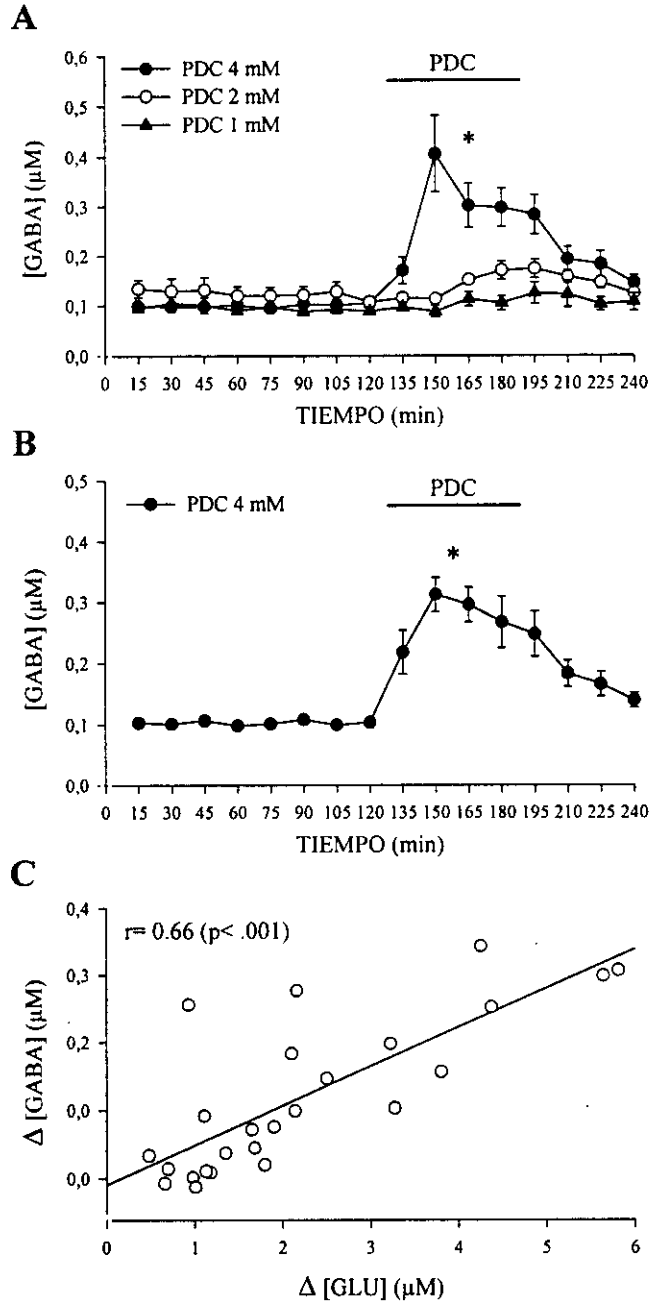
#### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de GABA en el núcleo accumbens de ratas de edad vieja y muy vieja fue  $0.13 \pm 0.02 \mu\text{M}$  y  $0.10 \pm 0.01 \mu\text{M}$ , respectivamente.

La perfusión de PDC (4 mM) en el núcleo accumbens de ratas de edad vieja produjo un incremento de la concentración extracelular de GABA de  $0.77 \pm 0.21 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 60A). Al igual que en el estriado, PDC a las dosis de 2 mM produjo un incremento no significativo retrasado en el tiempo en la concentración de GABA de  $0.07 \pm 0.01 \mu\text{M}$  (Fig. 60A). La dosis de 1 mM de PDC no modificó significativamente la concentración de GABA (Fig. 60A). La perfusión de PDC (4 mM) ratas de edad muy vieja produjo un incremento de la concentración extracelular de GABA de  $0.71 \pm 0.32 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 60B). Los incrementos de GABA en ratas viejas y muy viejas se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.76$ ;  $p < 0.001$ ). El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de GABA y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada en ratas jóvenes fue  $r = 0.57$  ( $p < 0.01$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.54$  ( $p < 0.001$ )].

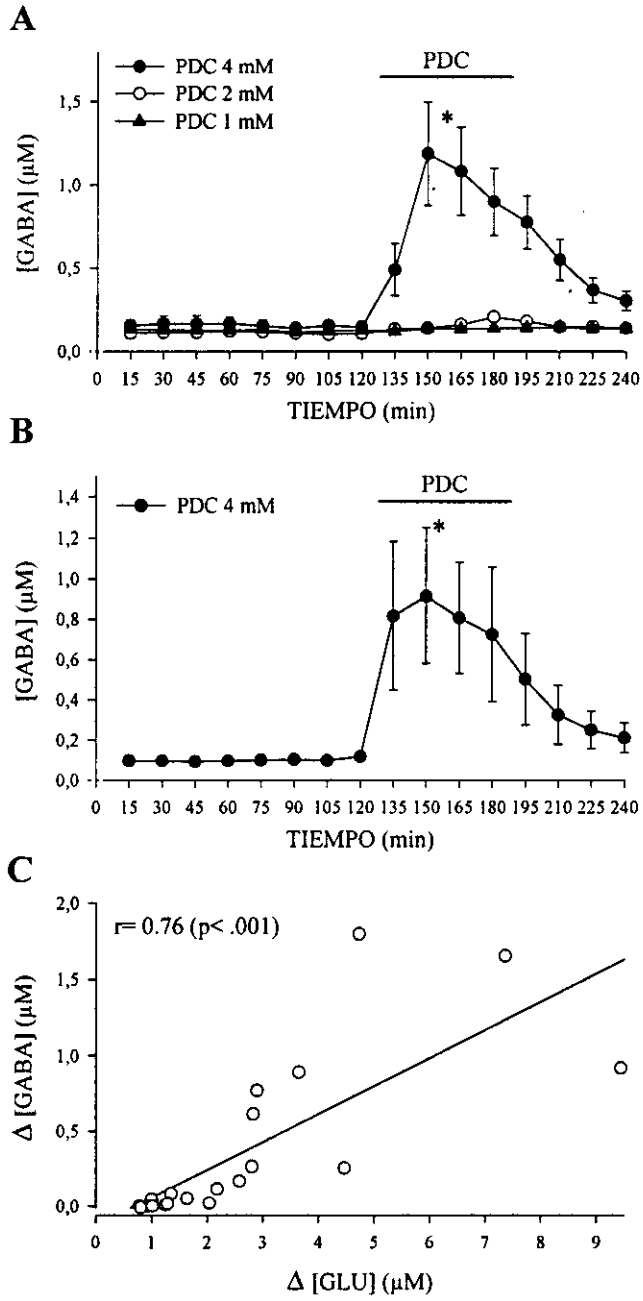
## Resultados

### ESTRIADO



**Figura 59:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de GABA de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato.

N. ACCUMBENS



**Figura 60:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de GABA de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato.

#### **4.4 Taurina**

##### Estriado

La concentración extracelular basal de taurina en el estriado de ratas de edad vieja y muy vieja fue  $0.68 \pm 0.06 \mu\text{M}$  y  $0.83 \pm 0.10 \mu\text{M}$ , respectivamente.

La perfusión de PDC (1, 2 y 4 mM) en el estriado de ratas viejas incrementó la concentración extracelular de taurina (Fig. 61A). Los incrementos medios de la concentración de taurina fueron:  $1.33 \pm 0.28 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM,  $0.52 \pm 0.17 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 2 mM, y  $0.50 \pm 0.18 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 1 mM (Fig. 61A). La perfusión de PDC (4 mM) en ratas muy viejas produjo un incremento de la concentración de taurina de  $1.48 \pm 0.35 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 61B). Los incrementos de taurina en ratas viejas y muy viejas se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.84$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 61C). El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de taurina y de glutamato independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.79$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.83$  ( $p < 0.001$ )].

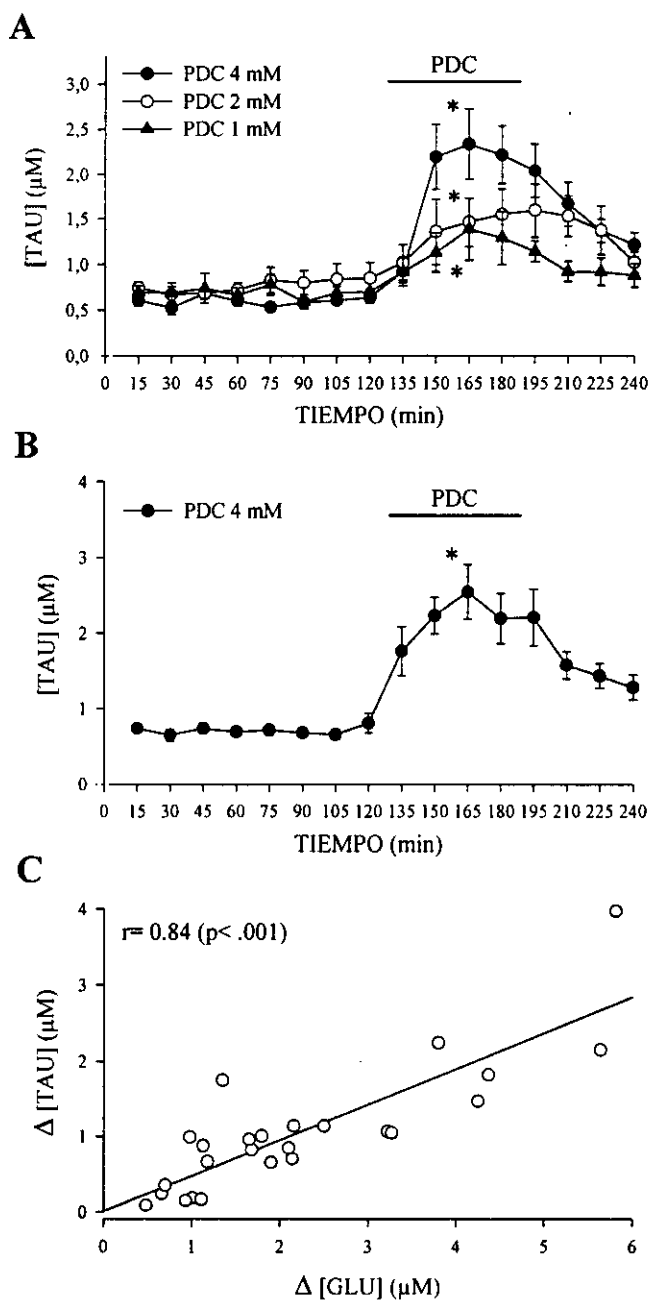
##### Núcleo accumbens

La concentración extracelular basal de taurina en el núcleo accumbens de ratas de edad vieja y muy vieja fue  $1.02 \pm 0.13 \mu\text{M}$  y  $0.70 \pm 0.09 \mu\text{M}$ , respectivamente.

La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (2 y 4 mM) produjo un incremento de la concentración extracelular de taurina de  $2.00 \pm 0.59 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) para la dosis de 4 mM y  $0.78 \pm 0.13 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 2 mM (Fig. 62A). La dosis de 1 mM produjo un incremento no significativo en la concentración de taurina de  $0.55 \pm 0.17 \mu\text{M}$  (Fig. 62A). La perfusión de PDC (4 mM) en ratas muy viejas produjo un incremento de la concentración de taurina de  $1.27 \pm 0.12 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 62B). Al igual que en ratas jóvenes, los incrementos de taurina en ratas viejas y muy viejas se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.89$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 62B). El coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de taurina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.86$  ( $p < 0.001$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.83$  ( $p < 0.001$ )].

## Resultados

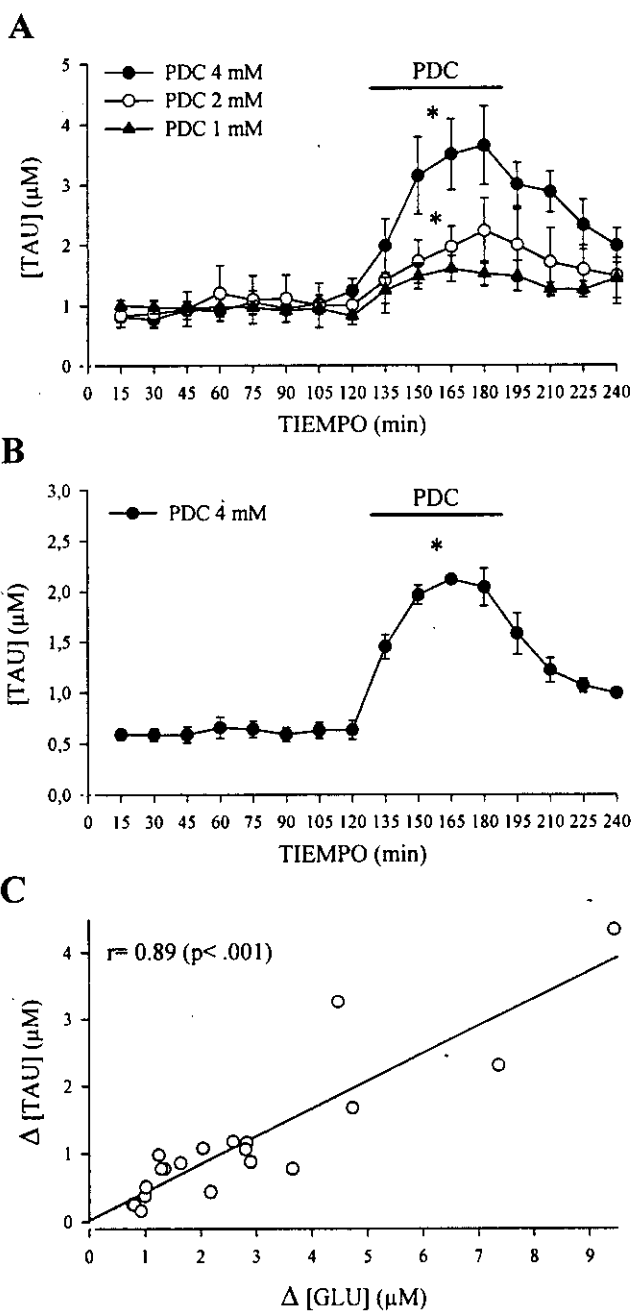
### ESTRIADO



**Figura 61:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de taurina de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato.

Resultados

N. ACCUMBENS



**Figura 62:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de taurina de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato.

## 4.5 Glutamina

### Estriado

La concentración extracelular basal de glutamina en el estriado de ratas viejas y muy viejas fue  $13.54 \pm 0.61 \mu\text{M}$  y  $17.15 \pm 1.25 \mu\text{M}$ , respectivamente. En ratas de edad vieja y muy vieja, los incrementos de glutamato y la glutamina basal estuvieron significativamente correlacionados: el coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de glutamato y la concentración basal de glutamina independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.51$  ( $p < 0.02$ ). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.53$  ( $p < 0.001$ )].

La perfusión de PDC (4 mM) en el estriado de ratas viejas produjo un descenso de la concentración extracelular de glutamina de  $1.86 \pm 0.51 \mu\text{M}$  ( $p < 0.01$ ) (Fig. 63A). PDC a las dosis de 1 y 2 mM no modificó la concentración de glutamina. La perfusión de PDC (4 mM) en el estriado de ratas muy viejas también produjo un descenso de la concentración de glutamina de  $2.17 \pm 0.54 \mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) (Fig. 63B). Los descensos de glutamina en ratas viejas y muy viejas se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.40$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 63C). El coeficiente de correlación parcial entre los descensos de glutamina y de glutamato independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.15$  (n.s.). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.48$  ( $p < 0.001$ )].

### Núcleo accumbens

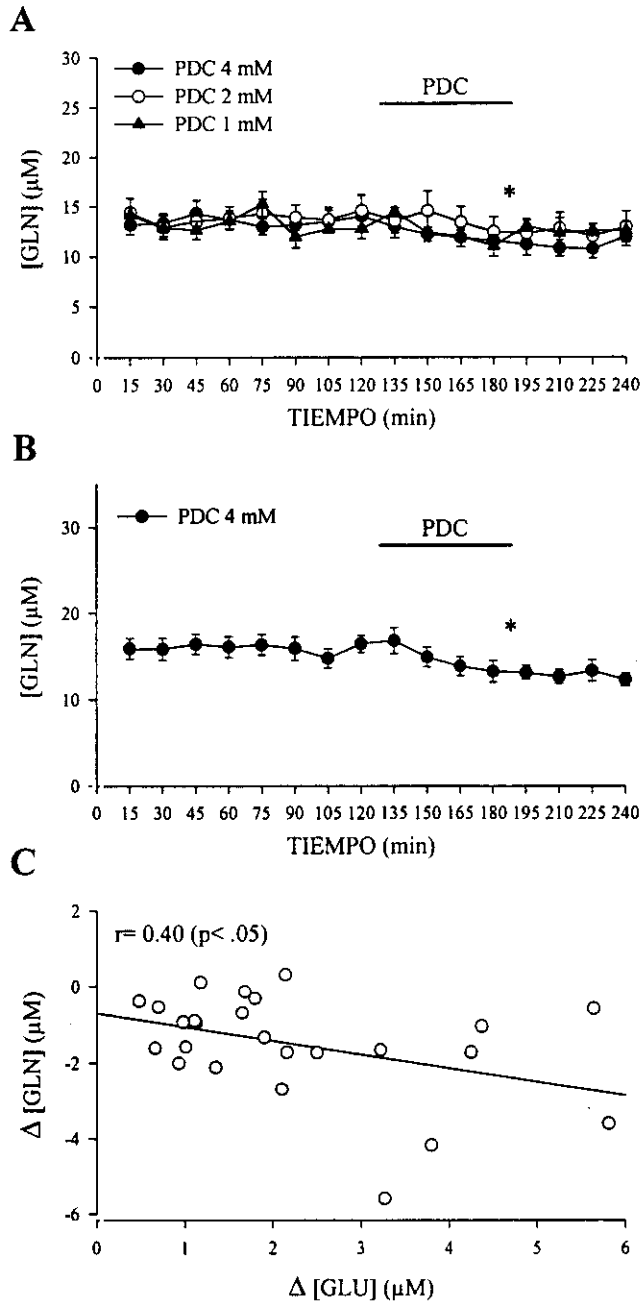
La concentración extracelular basal de glutamina en el núcleo accumbens de ratas de edad vieja y muy vieja fue  $17.97 \pm 1.01 \mu\text{M}$  y  $16.18 \pm 11.13 \mu\text{M}$ , respectivamente. Al contrario que en el estriado, los incrementos de glutamato no se correlacionaron con la concentración basal de glutamina: el coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de glutamato y la concentración extracelular basal de glutamina independiente de la dosis de PDC fue  $r = 0.12$  (n.s.). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.33$  ( $p < 0.02$ )].

La perfusión en el núcleo accumbens de PDC (4 mM) produjo un descenso de la concentración extracelular de glutamina de  $1.31 \pm 0.52 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 64A). PDC a las dosis de 1 y 2 mM no modificó significativamente la concentración de glutamina (Fig. 64A). La perfusión de PDC (4 mM) en ratas de edad muy vieja también produjo un descenso de la concentración de glutamina de  $2.54 \pm 0.30 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 64B). Los descensos de glutamina en ratas viejas y muy viejas no se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato ( $r = 0.14$ ; n.s.) (Fig. 64C). El coeficiente de correlación parcial entre los descensos de glutamina y de glutamato independiente de la dosis de PDC utilizada fue  $r = 0.06$  (n.s.). [NOTA: el coeficiente de correlación parcial obtenido a partir de todos los datos en el estudio fue  $r = 0.23$  (n.s.)].



Resultados

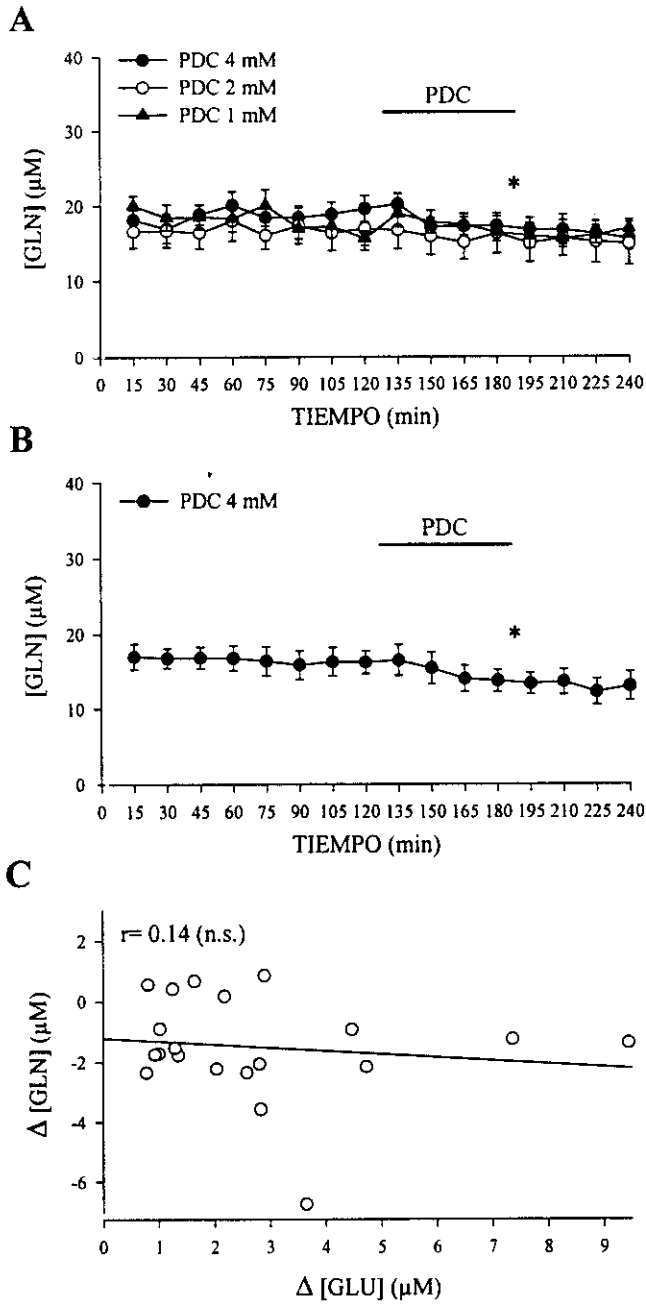
ESTRIADO



**Figura 63:** Efecto de la perfusión en el estriado de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamina de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato.

Resultados

N. ACCUMBENS



**Figura 64:** Efecto de la perfusión en el núcleo accumbens de PDC (1, 2 y 4 mM) sobre la concentración extracelular de glutamina de ratas de edad vieja (27-30 meses) (A) y ratas de edad muy vieja (37 meses) (B) (\*  $p < 0.05$  comparado con su control). (C) correlación entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato.

## **5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE AMINOÁCIDOS Y CATECOLAMINAS EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA DESPIERTA**

### **5.1 Glutamato**

Como se puede ver en las Figuras 65A y 68A, no hubo diferencias en la concentración extracelular de glutamato entre los diferentes grupos de edad estudiados, ni en el estriado ni en el núcleo accumbens de la rata despierta.

### **5.2 GABA**

Al igual que para el glutamato, no se observaron, ni en el estriado ni en el núcleo accumbens, diferencias en la concentración extracelular de GABA entre los diferentes grupos de edad estudiados (Fig. 65B y 68B).

### **5.3 Taurina**

Como se puede ver en las Figuras 66A y 69A, no hubo cambios en la concentración extracelular de taurina entre los diferentes grupos de edad estudiados, ni en el estriado ni en el núcleo accumbens de la rata despierta.

### **5.4 Glutamina**

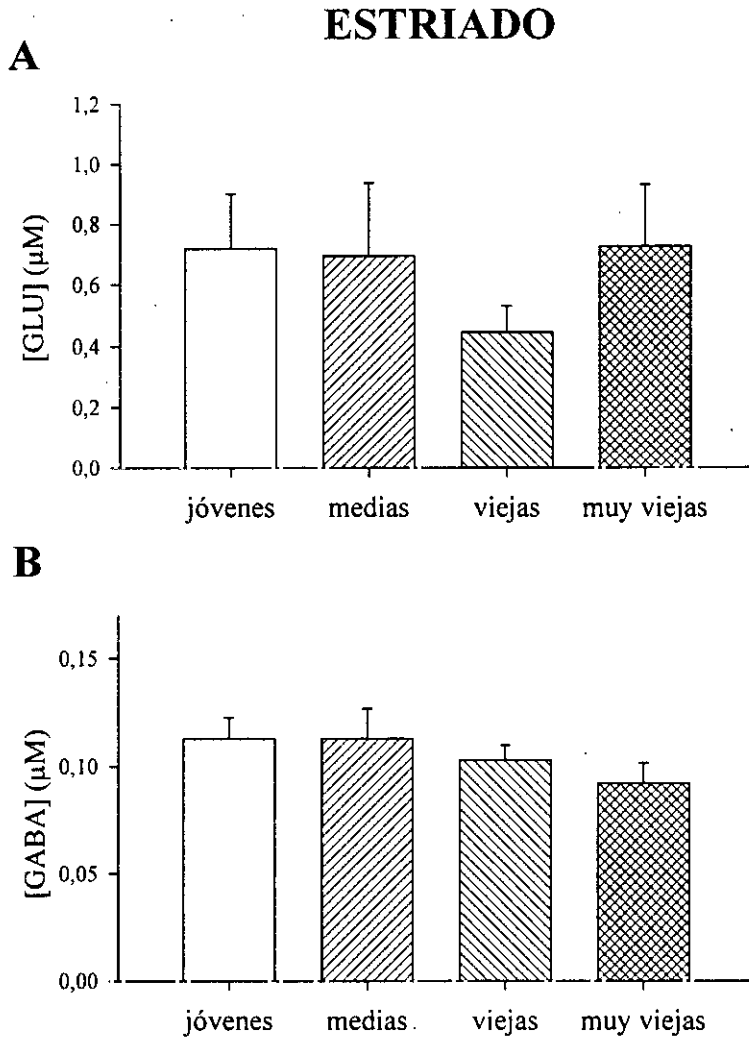
La concentración extracelular de glutamina en el estriado no se modificó a lo largo del envejecimiento (Fig. 66B). Por el contrario, la concentración extracelular de glutamina fue mayor en ratas de edad media, vieja y muy vieja que en ratas jóvenes (Fig. 69B). También se observó una correlación positiva significativa entre la concentración de glutamina y la edad en el núcleo accumbens ( $r = 0.40$ ;  $p < 0.01$ ).

### **5.5 Dopamina y metabolitos**

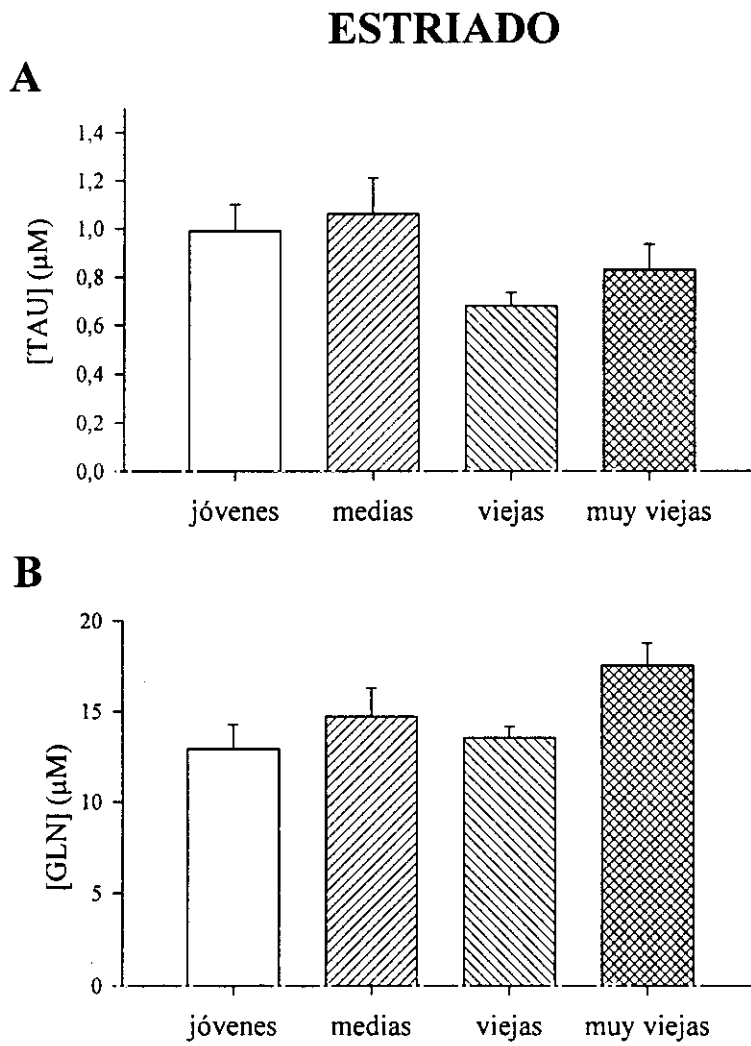
Como se puede ver en la Figura 67A, no hubo cambios significativos en la concentración extracelular de dopamina en el estriado, aunque se puede observar una tendencia no significativa a aumentar con la edad. Sin embargo, la concentración de dopamina en el núcleo accumbens fue menor en ratas de edad media, vieja y muy vieja que en ratas jóvenes (Figura 70A).

La concentración extracelular de DOPAC y HVA no varió significativamente en ninguno de los grupos de edad estudiado, ni en el estriado ni en el núcleo accumbens, aunque se observó una tendencia significativa de la concentración de HVA en el núcleo accumbens a ser menor con la edad ( $r = 0.37$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 67B y C, y Fig. 70B y C).

Resultados

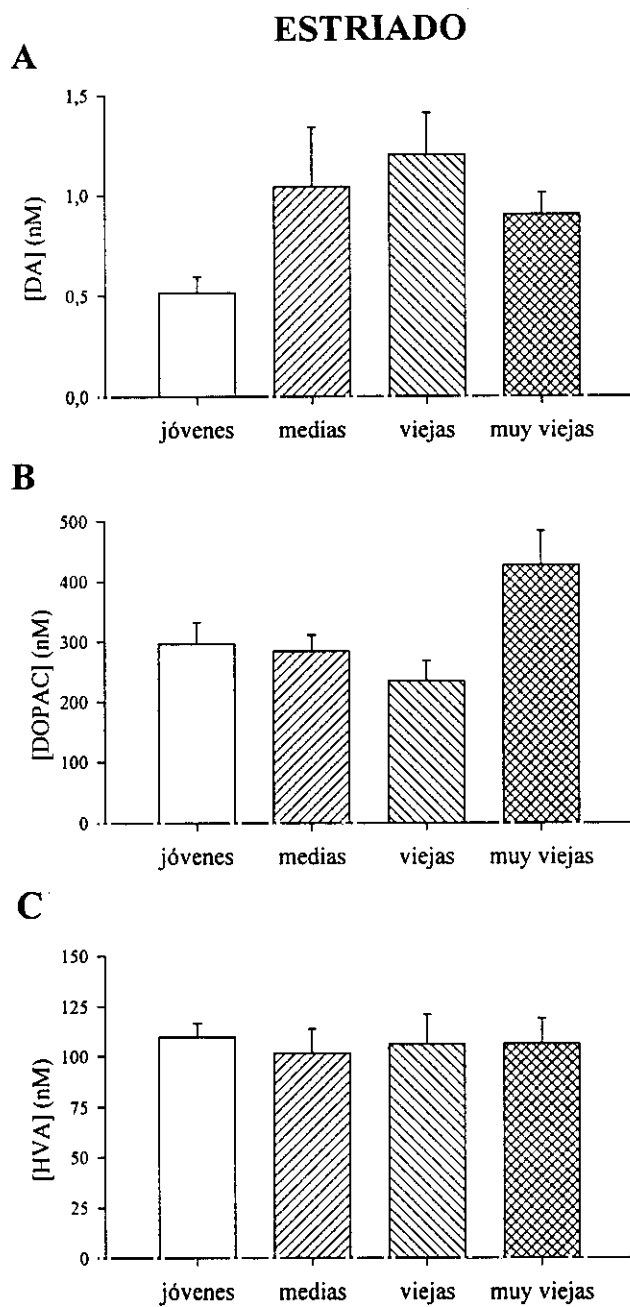


**Figura 65:** Efecto del envejecimiento sobre la concentración extracelular de (A) glutamato y (B) GABA en el estriado de la rata despierta.



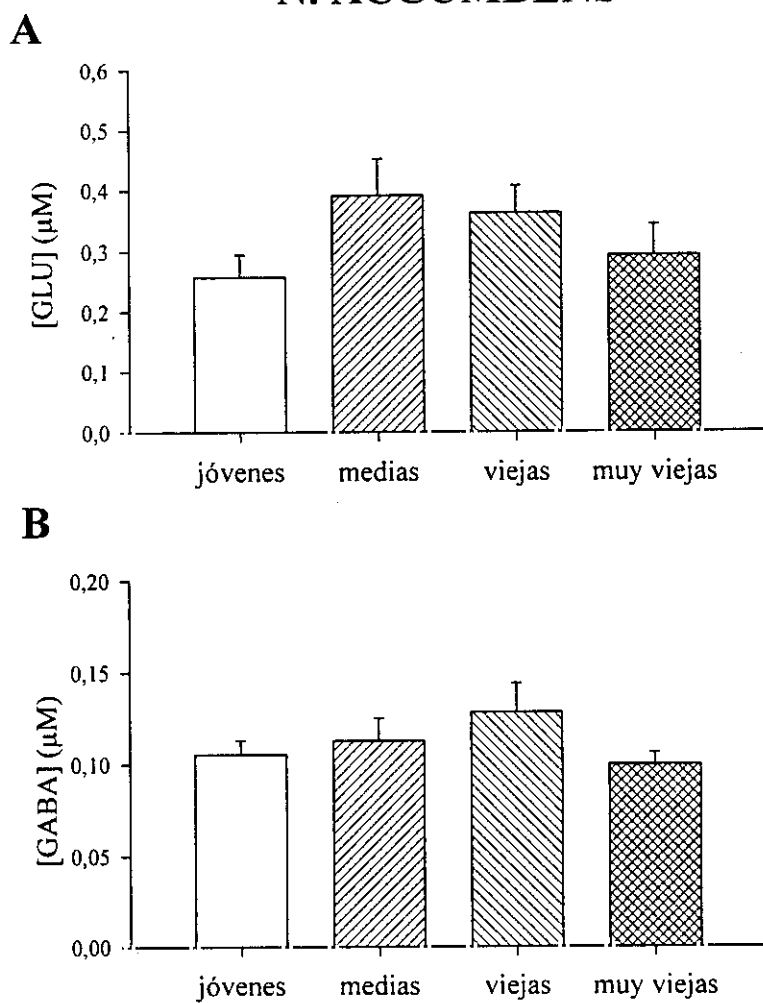
**Figura 66:** Efecto del envejecimiento sobre la concentración extracelular de (A) taurina y (B) glutamina en el estriado de la rata despierta.

## Resultados



**Figura 67:** Efecto del envejecimiento sobre la concentración extracelular de (A) dopamina, (B) DOPAC y (C) HVA en el estriado de la rata despierta.

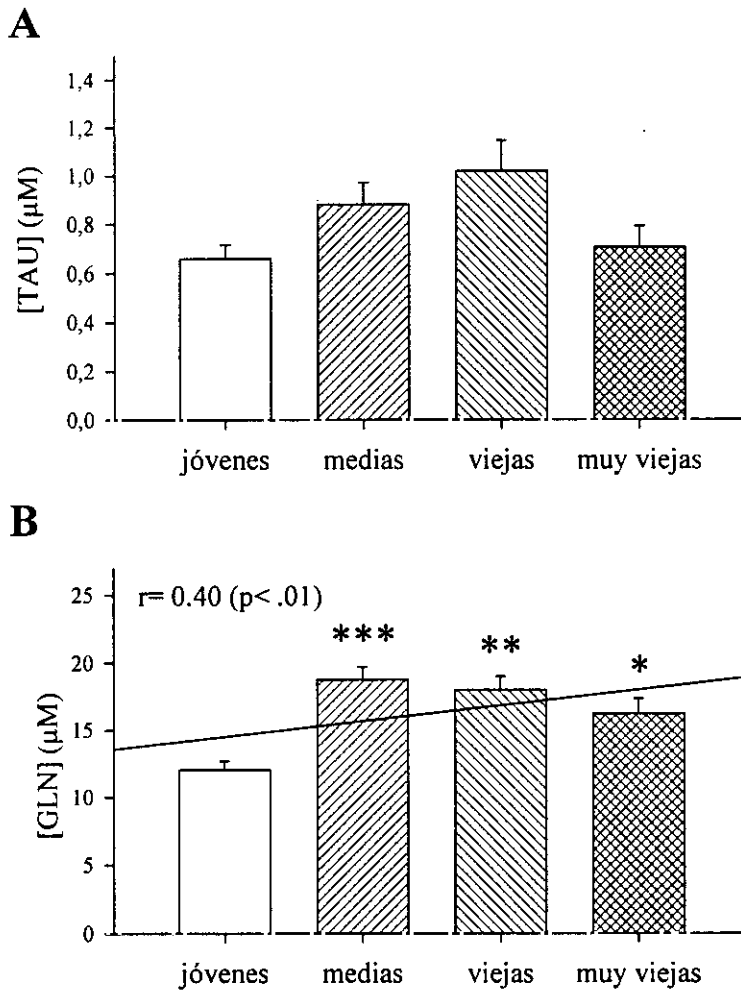
### N. ACCUMBENS



**Figura 68:** Efecto del envejecimiento sobre la concentración extracelular de (A) glutamato y (B) GABA en el núcleo accumbens de la rata despierta.

Resultados

N. ACCUMBENS

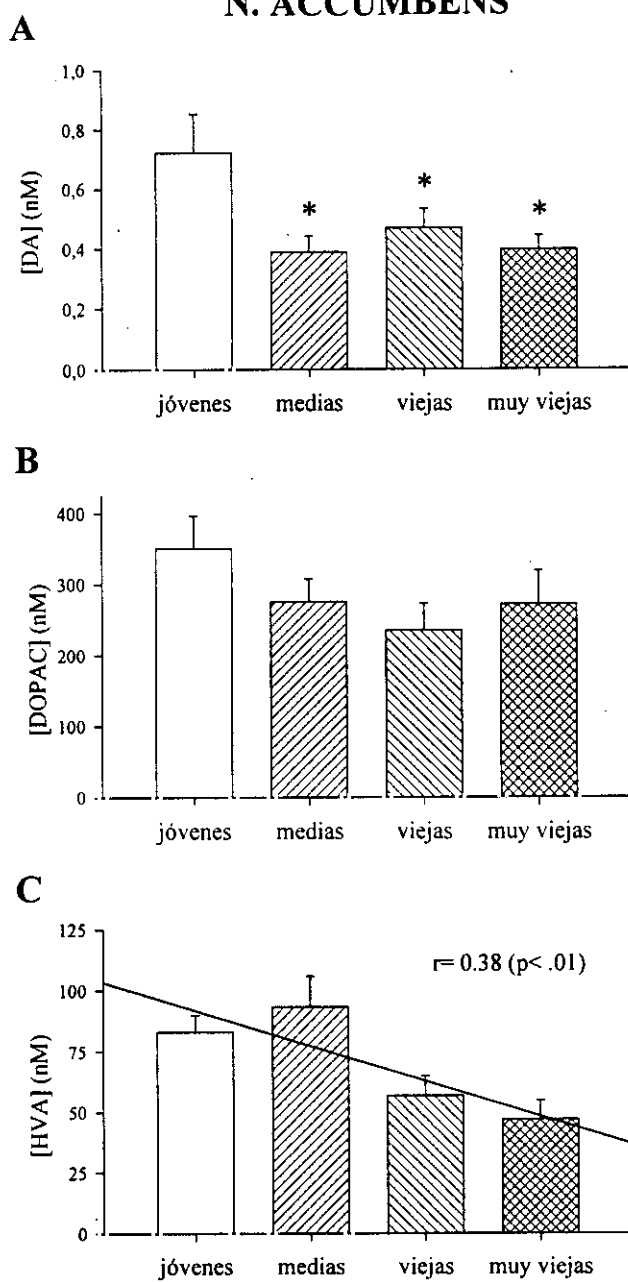


**Figura 69:** Efecto del envejecimiento sobre la concentración extracelular de (A) taurina y (B) glutamina en el núcleo accumbens de la rata despierta (\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado con ratas jóvenes).



## Resultados

### N. ACCUMBENS



**Figura 70:** Efecto del envejecimiento sobre la concentración extracelular de (A) dopamina, (B) DOPAC y (C) HVA en el núcleo accumbens de la rata despierta.

## **6. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LAS INTERACCIONES ENTRE AMINOÁCIDOS Y CATECOLAMINAS EN EL ESTRIADO Y NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA DESPIERTA**

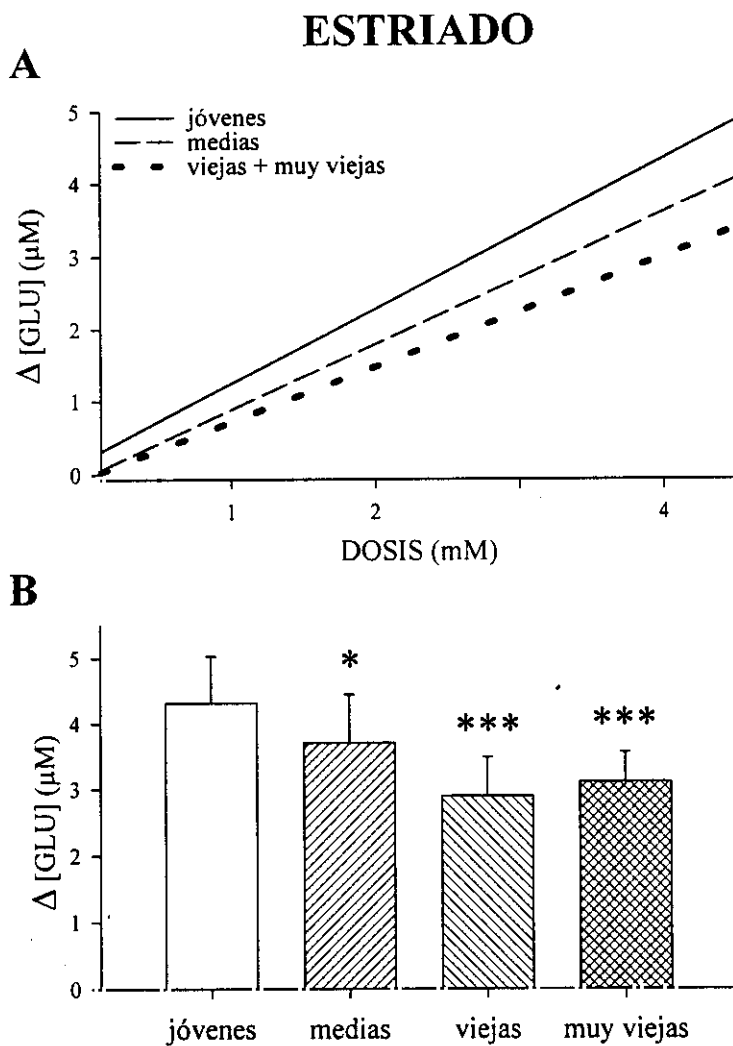
### **6.1 Glutamato**

#### Estriado

Como se puede ver en la Figura 71A, la relación dosis-respuesta entre los incrementos de la concentración de glutamato y la dosis de PDC no varió entre los grupos de edad estudiados, aunque se observa una tendencia a disminuir con la edad la potencia del PDC para inducir incrementos de glutamato. Esta tendencia se confirma al analizar los incrementos de glutamato a la dosis de 4 mM de PDC en los diferentes grupos de edad estudiados. Como se puede ver en la Figura 71B, el incremento de glutamato fue menor en ratas de edad media, viejas y muy viejas que en ratas jóvenes.

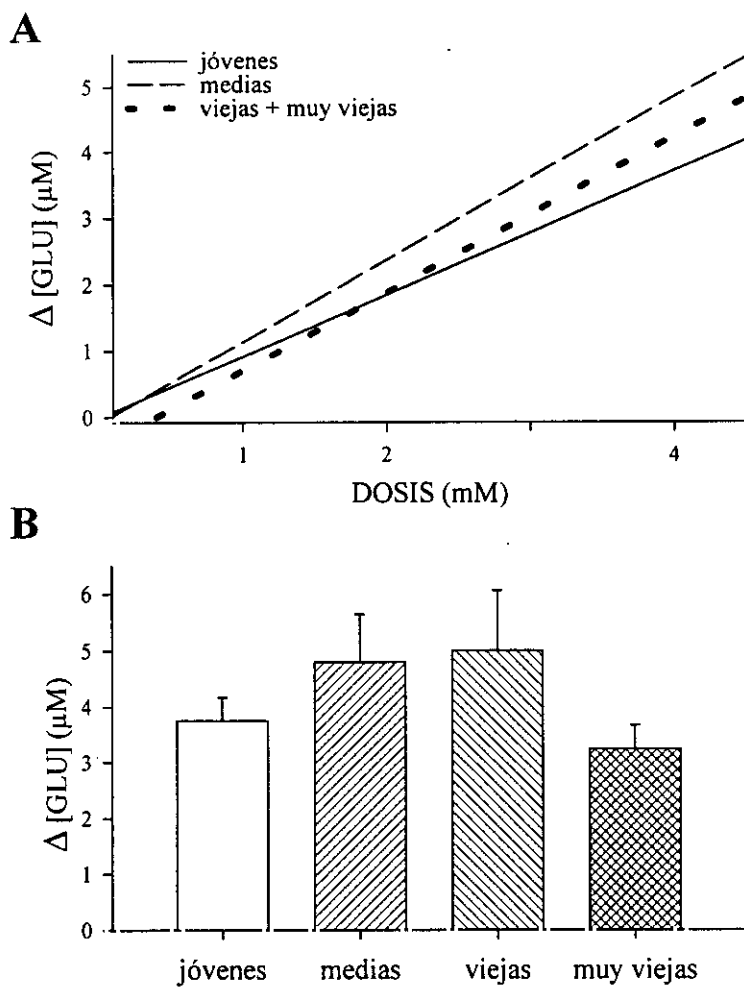
#### Núcleo accumbens

A diferencia con en el estriado, ni la relación dosis-respuesta entre los incrementos de glutamato y la dosis de PDC ni los incrementos de glutamato a la dosis de 4 mM de PDC se modificaron con la edad en el núcleo accumbens (Fig. 72).



**Figura 71:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de glutamato en el estriado de la rata despierta. (A) correlación entre la dosis de PDC y los incrementos de glutamato. (B) incrementos de glutamato a la dosis de 4 mM de PDC (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado con ratas jóvenes).

**N. ACCUMBENS**



**Figura 72:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de glutamato en el núcleo accumbens de la rata despierta. (A) correlación entre la dosis de PDC y los incrementos de glutamato. (B) incrementos de glutamato a la dosis de 4 mM de PDC.

## *Resultados*

### **6.2 Dopamina y metabolitos**

#### Estriado

Como se puede ver en la Figura 73A la pendiente de la recta de regresión obtenida para la correlación entre los incrementos de dopamina y glutamato en el estriado de ratas viejas no fue significativamente diferente a la obtenida en ratas jóvenes, indicando que el glutamato fue igual de potente para inducir incrementos de dopamina en animales jóvenes y viejos. Sin embargo, la pendiente de la recta obtenida en ratas de edad media fue significativamente mayor comparada con la obtenida en ratas jóvenes ( $p < 0.01$ ), indicando que a iguales incrementos de glutamato se obtuvieron mayores incrementos de dopamina en animales de edad media que en animales jóvenes (Fig. 73A). No se observaron diferencias en el cociente entre los incrementos de dopamina y los de glutamato para la dosis de 4 mM de PDC entre los diferentes grupos de edad estudiados, aunque se observó una diferencia no significativa en ratas de edad media, confirmando el aumento de los incrementos de dopamina a igual incremento de glutamato en este grupo de edad (Fig. 73 B).

No se encontraron diferencias significativas entre la pendiente de las rectas de regresión para la relación entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato obtenidas en los diferentes grupos de edad estudiados, aunque se observó una tendencia no significativa de las pendientes a ser mayores con la edad (Fig. 74A y 75A). De la misma manera, tampoco se encontraron diferencias en el cociente entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de (PDC 4 mM) entre los diferentes grupos de edad estudiados (Fig. 74B y 75B).

#### Núcleo accumbens

La pendiente de la recta de regresión obtenida para la relación entre los incrementos de dopamina y los de glutamato en el núcleo accumbens de ratas viejas fue significativamente menor a la obtenida en ratas jóvenes ( $p < 0.05$ ), indicando que el glutamato fue menos potente para incrementar la concentración de dopamina en ratas viejas que en ratas jóvenes (Fig. 76A). También se observó una diferencia no significativa de la pendiente de la recta obtenida en ratas de edad media comparada con la de ratas jóvenes (Fig. 76A). Estos cambios se confirman al estudiar el cociente entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato para la dosis de 4 mM de PDC. Como se puede ver en la Figura 76B, el cociente obtenido en ratas de edad media, vieja y muy vieja fue menor al obtenido en ratas jóvenes, existiendo, además, una tendencia significativa de este cociente a ser menor con la edad ( $r = 0.55$ ;  $p < 0.01$ ). Por tanto, estos resultados muestran que los incrementos de dopamina, a iguales incrementos de glutamato, se redujeron a lo largo del envejecimiento.

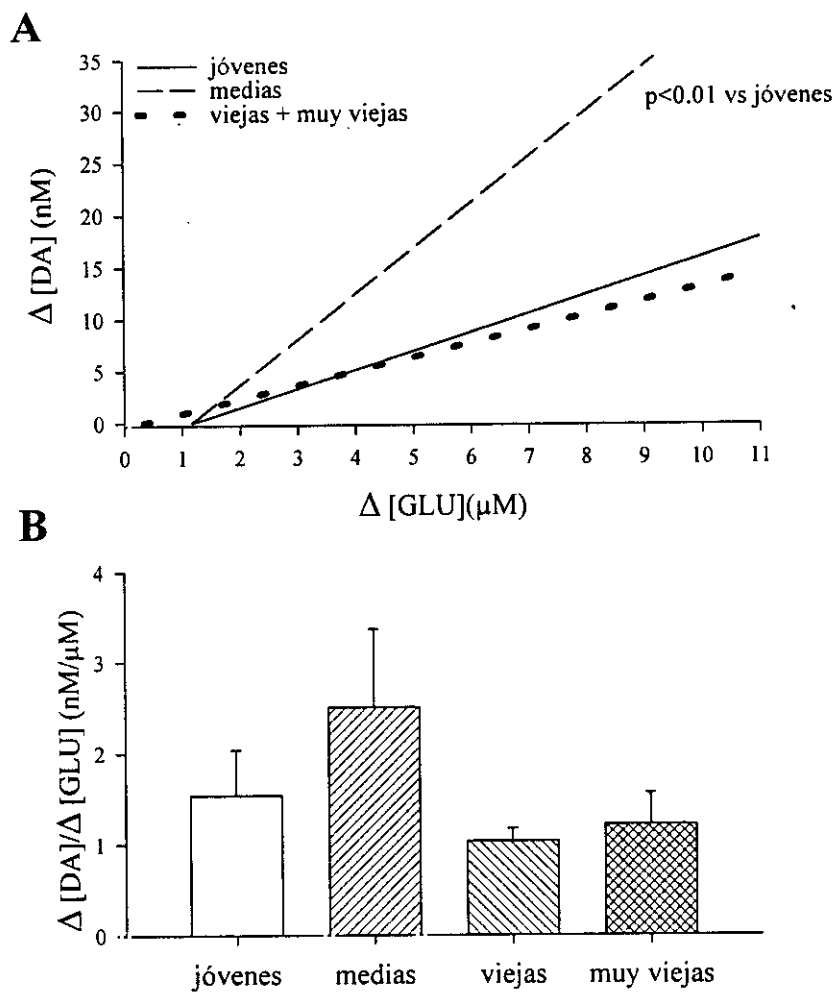
No hubo diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de regresión para las relaciones entre los descensos de DOPAC y HVA y los

## *Resultados*

incrementos de glutamato obtenidas en los diferentes grupos de edad estudiados, aunque se observó una tendencia no significativa de estas pendientes a ser menores con la edad (Fig. 77A y 78A). Tampoco se observaron diferencias entre los diferentes grupos de edad en los cocientes entre los descensos de DOPAC y HVA y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) (Fig. 77B y 78B).

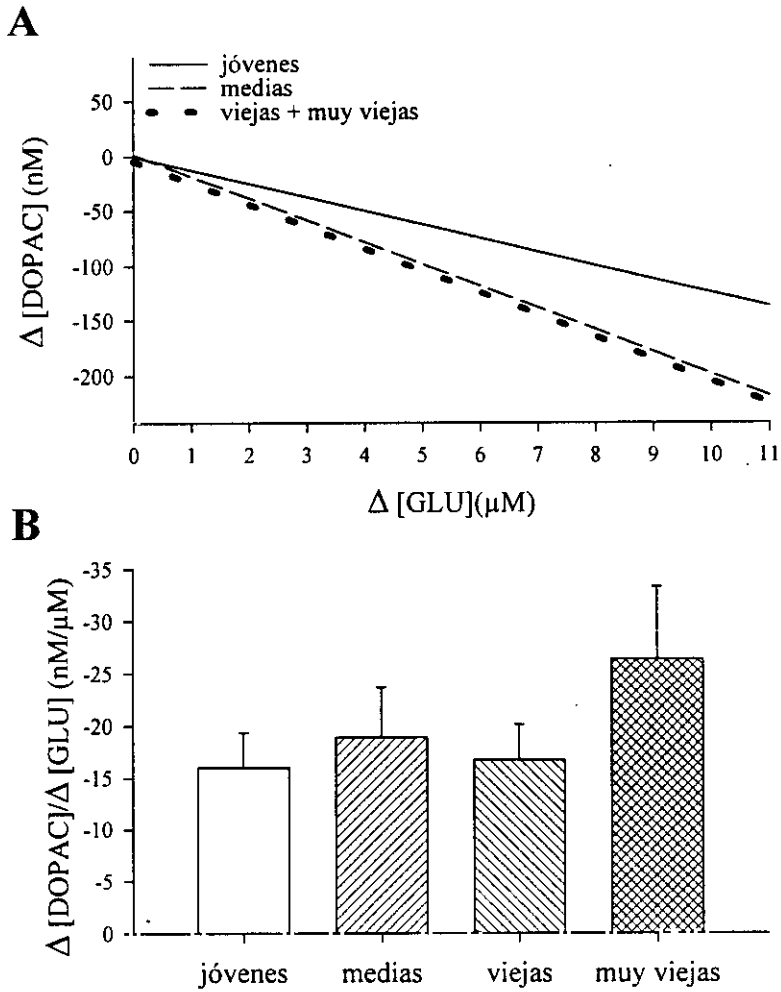
## Resultados

### ESTRIADO



**Figura 73:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de dopamina en el estriado de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los incrementos de dopamina. (B) cociente entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

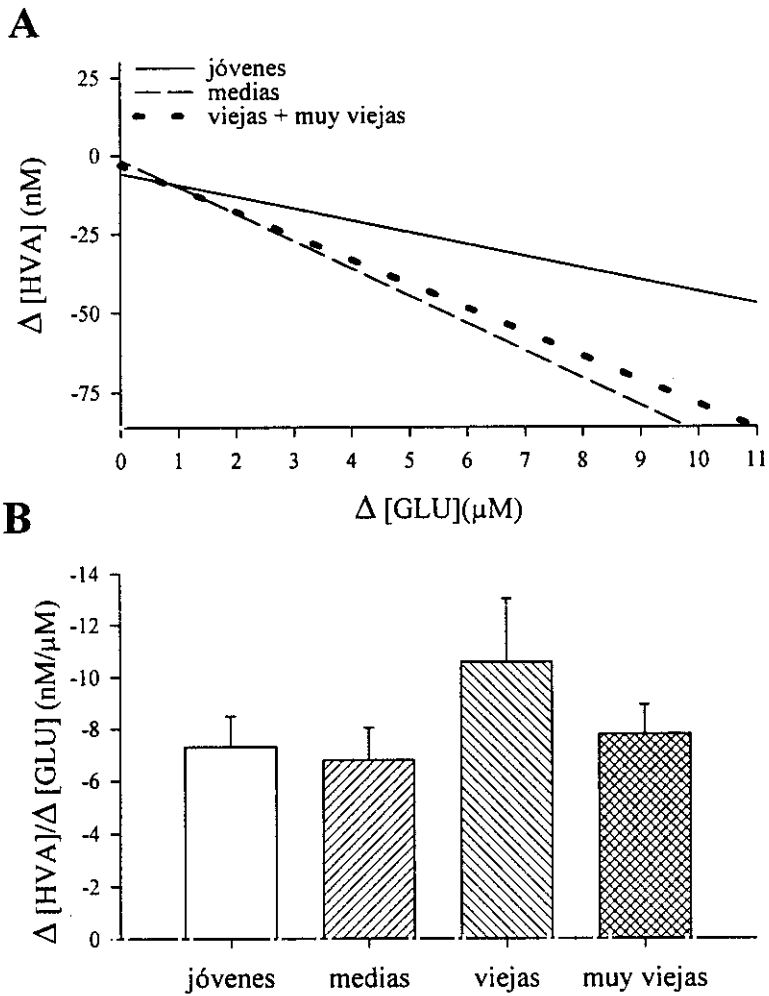
## ESTRIADO



**Figura 74:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de DOPAC en el estriado de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los descensos de DOPAC. (B) cociente entre los descensos de DOPAC y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

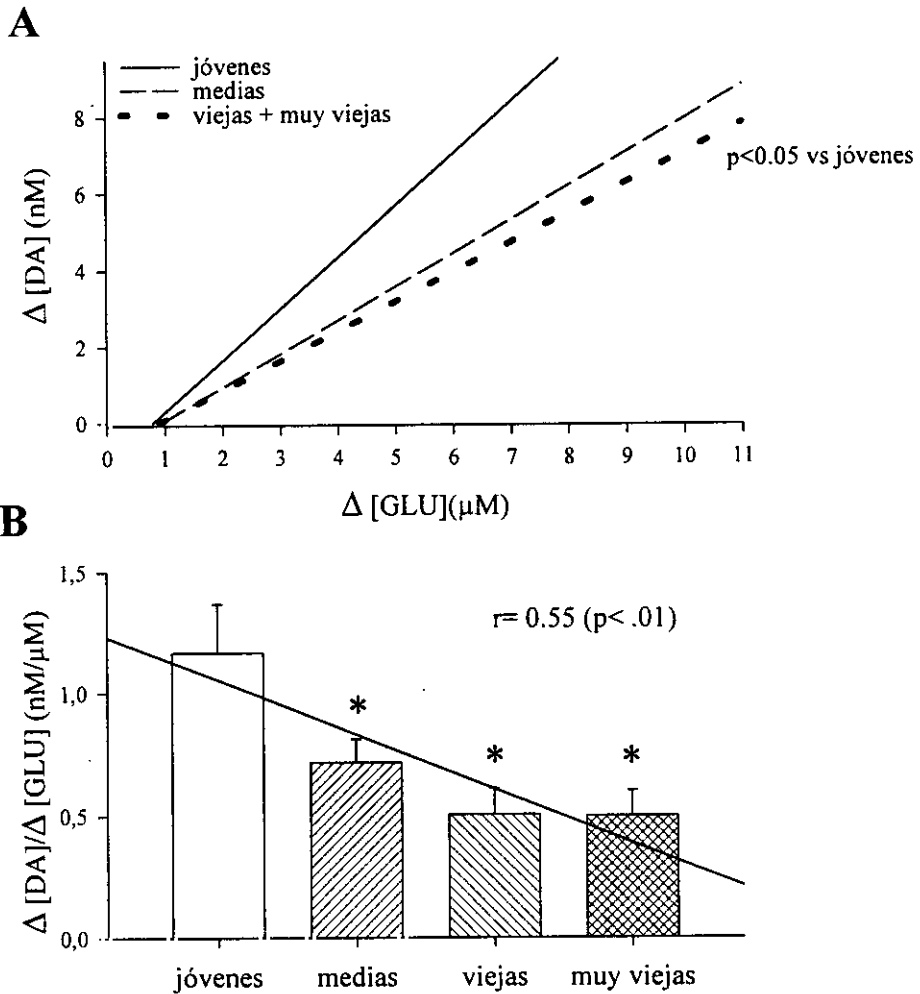


## ESTRIADO



**Figura 75:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de HVA en el estriado de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los descensos de HVA. (B) cociente entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

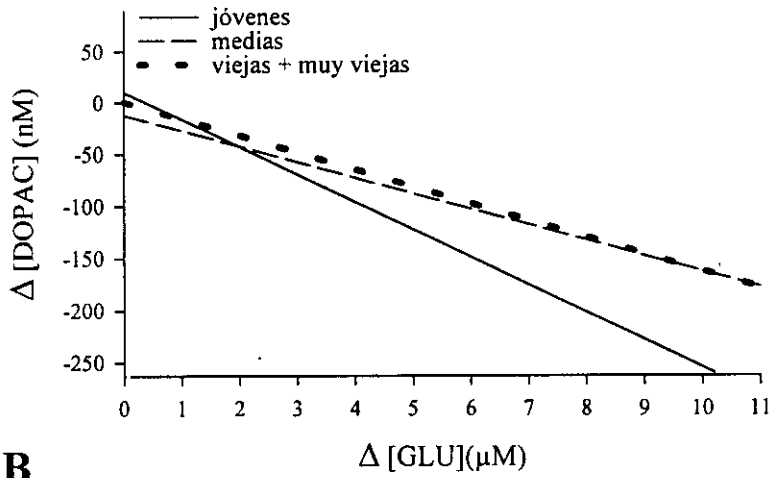
N. ACCUMBENS



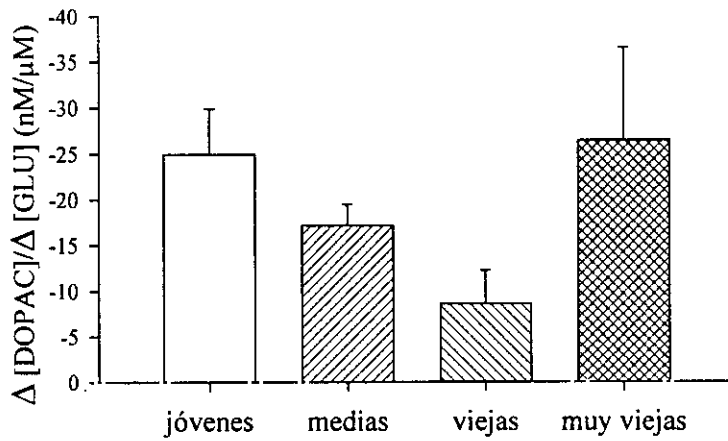
**Figura 76:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens de la rata despierta. **(A)** correlación entre los incrementos de glutamato y los incrementos de dopamina. **(B)** cociente entre los incrementos de dopamina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) (\*  $p < 0.05$  comparado con ratas jóvenes).

N. ACCUMBENS

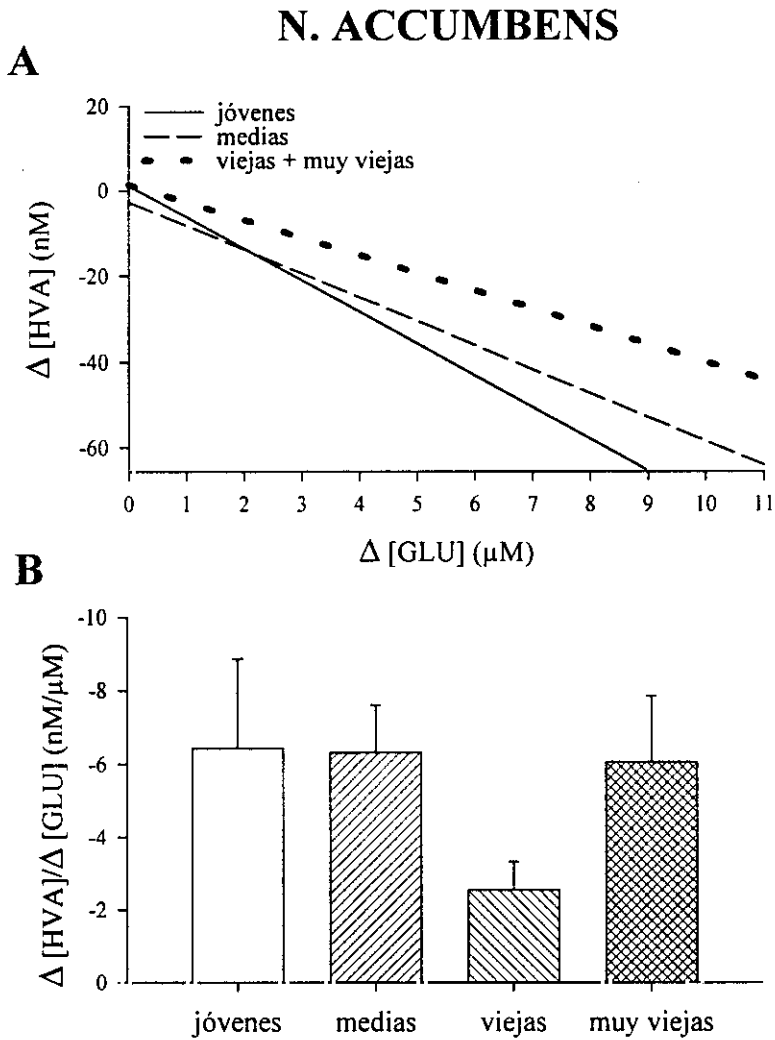
A



B



**Figura 77:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de DOPAC en el núcleo accumbens de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los descensos de DOPAC. (B) cociente entre los descensos de DOPAC y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).



**Figura 78:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de HVA en el núcleo accumbens de la rata despierta. **(A)** correlación entre los incrementos de glutamato y los descensos de HVA. **(B)** cociente entre los descensos de HVA y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

### **6.3 GABA**

#### Estriado

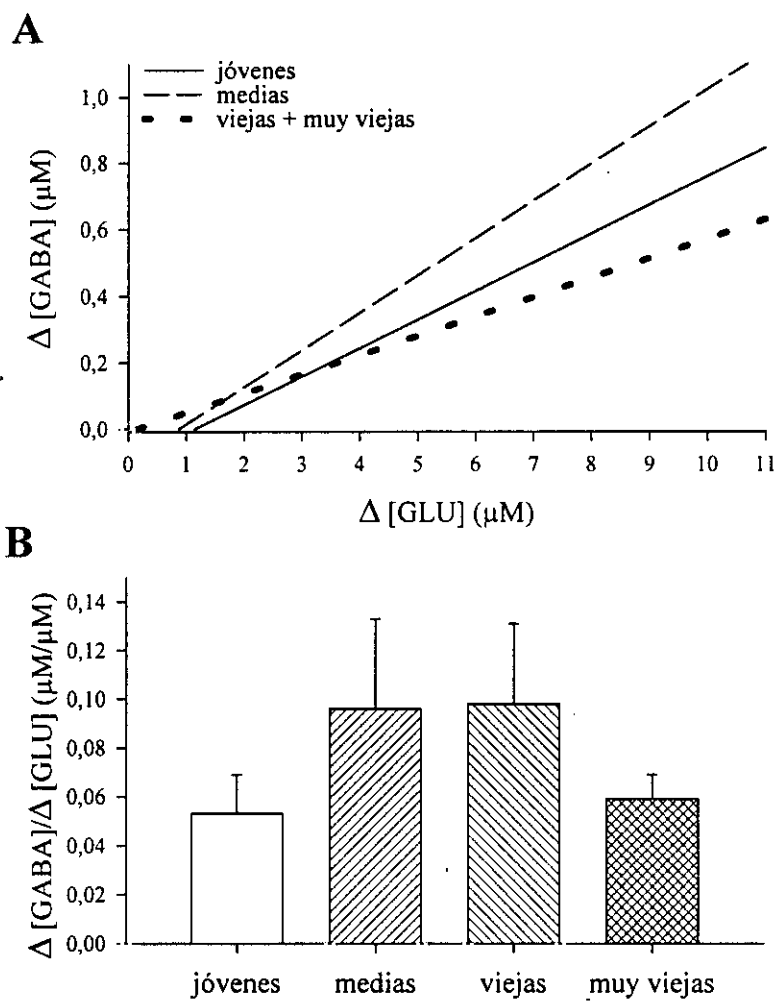
Como se puede ver en la Figura 79A, no se encontraron diferencias entre las pendientes de las rectas de regresión obtenidas en el estriado para la relación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato en los diferentes grupos de edad estudiado. De igual manera, tampoco se encontraron diferencias en los cocientes entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) en los diferentes grupos de edad (Fig. 79B). Estos resultados indican que los incrementos de GABA a iguales incrementos de glutamato no variaron a lo largo de la edad.

#### Núcleo accumbens

No se observaron diferencias entre las pendientes de las rectas de regresión obtenidas en el núcleo accumbens para la relación entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato en los diferentes grupos de edad estudiados (Fig. 80A). Como se puede ver en la Figura 80B, tampoco se encontraron diferencias significativas en los cocientes entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) en los diferentes grupos de edad; sin embargo, se observó una tendencia significativa del cociente a ser mayor con la edad ( $r= 0.38$ ;  $p < 0.05$ ), indicando que los incrementos de GABA a iguales incrementos de glutamato tendieron a ser mayores a lo largo del envejecimiento.

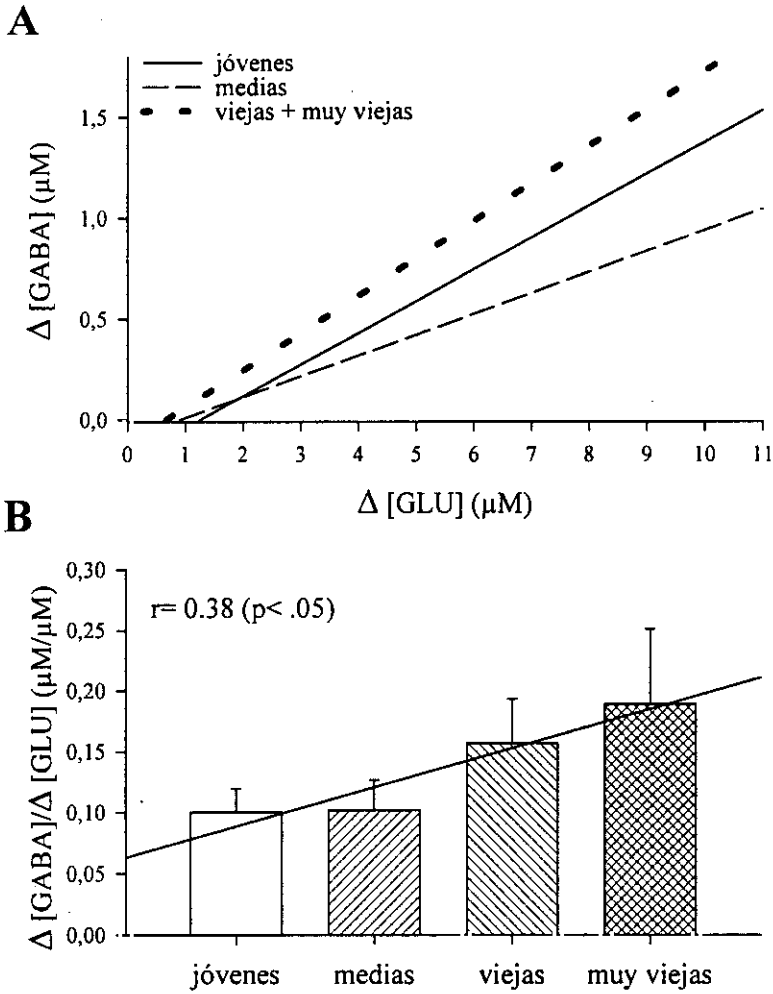
## Resultados

### ESTRIADO



**Figura 79:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de GABA en el estriado de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los incrementos de GABA. (B) cociente entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

N. ACCUMBENS



**Figura 80:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de GABA en el núcleo accumbens de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los incrementos de GABA. (B) cociente entre los incrementos de GABA y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

## **6.4 Taurina**

### Estriado

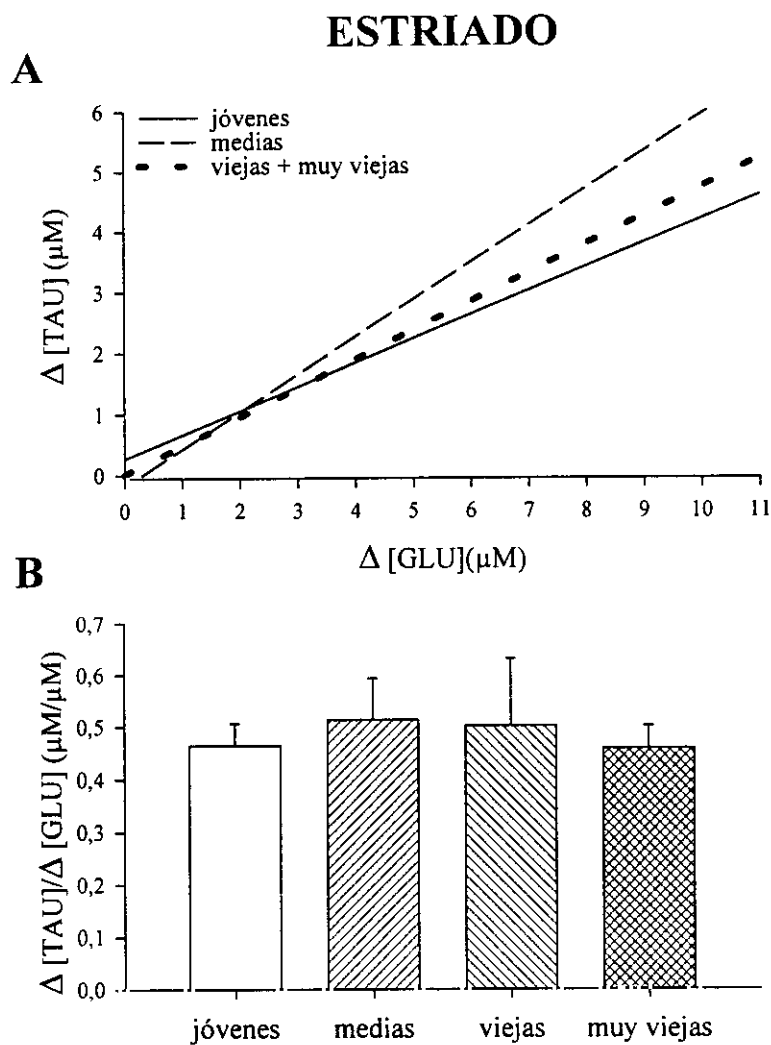
No se observaron diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de regresión obtenidas en el estriado para la relación entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato en los diferentes grupos de edad estudiados (Fig. 81A). De igual manera, tampoco se encontraron diferencias en los cocientes entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) en los diferentes grupos de edad (Fig. 81B). Estos resultados indican que los incrementos de taurina a iguales incrementos de glutamato no variaron a lo largo de la edad.

### Núcleo accumbens

Al igual que en el estriado, no se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de regresión obtenidas en el núcleo accumbens para la relación entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato en los diferentes grupos de edad estudiados (Fig. 82A). Tampoco se encontraron diferencias en los cocientes entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) en los diferentes grupos de edad (Fig. 82B). Como en el estriado, estos resultados indican que los incrementos de taurina a iguales incrementos de glutamato no variaron a lo largo de la edad.

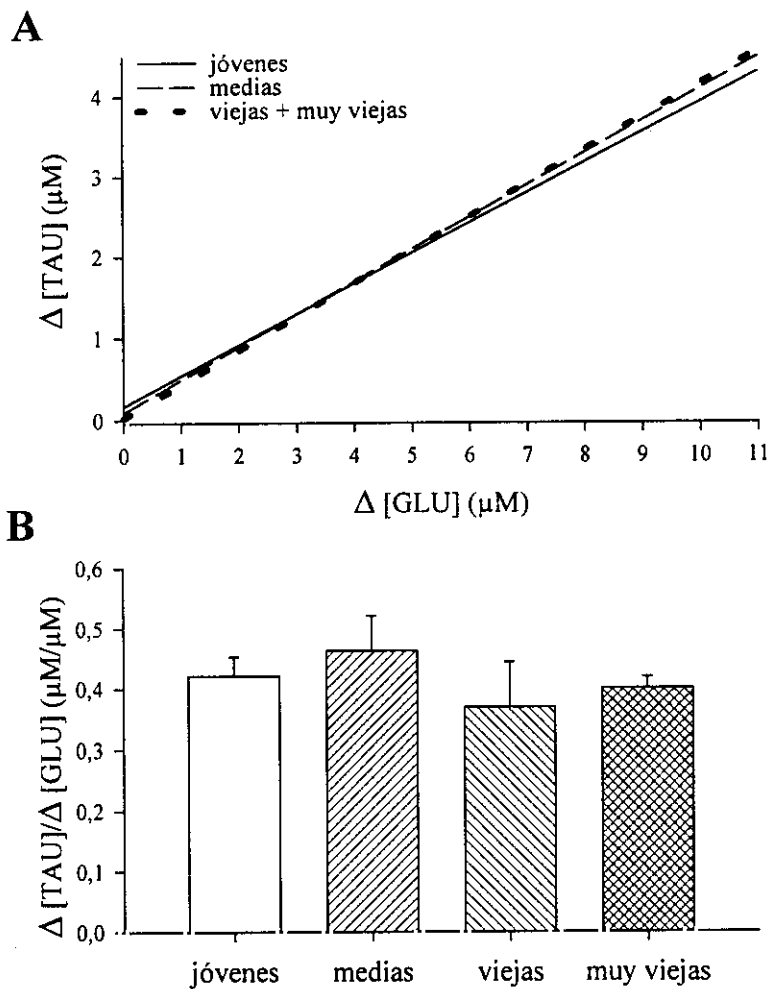


## Resultados



**Figura 81:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de taurina en el estriado de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los incrementos de. (B) cociente entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

### N. ACCUMBENS



**Figura 82:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de taurina en el núcleo accumbens de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los incrementos de. (B) cociente entre los incrementos de taurina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

## **6.5 Glutamina**

### Estriado

No se observaron diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de regresión obtenidas en el estriado para la relación entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato en los diferentes grupos de edad estudiados (Fig. 83A). De igual manera, tampoco se encontraron diferencias significativas en los cocientes entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) en los diferentes grupos de edad, aunque se observó una gran variabilidad en los resultados (Fig. 83B). Estos resultados indican que los descensos de glutamina a iguales incrementos de glutamato no variaron a lo largo de la edad.

Como se puede ver en la Figura 83C, el cociente entre los incrementos de glutamato y la concentración extracelular basal de glutamina para la dosis de 4 mM de PDC fue significativamente menor en ratas de edad muy vieja comparados con ratas jóvenes, existiendo, además, una tendencia significativa de este cociente a disminuir con la edad ( $r = 0.48$ ;  $p < 0.01$ ).

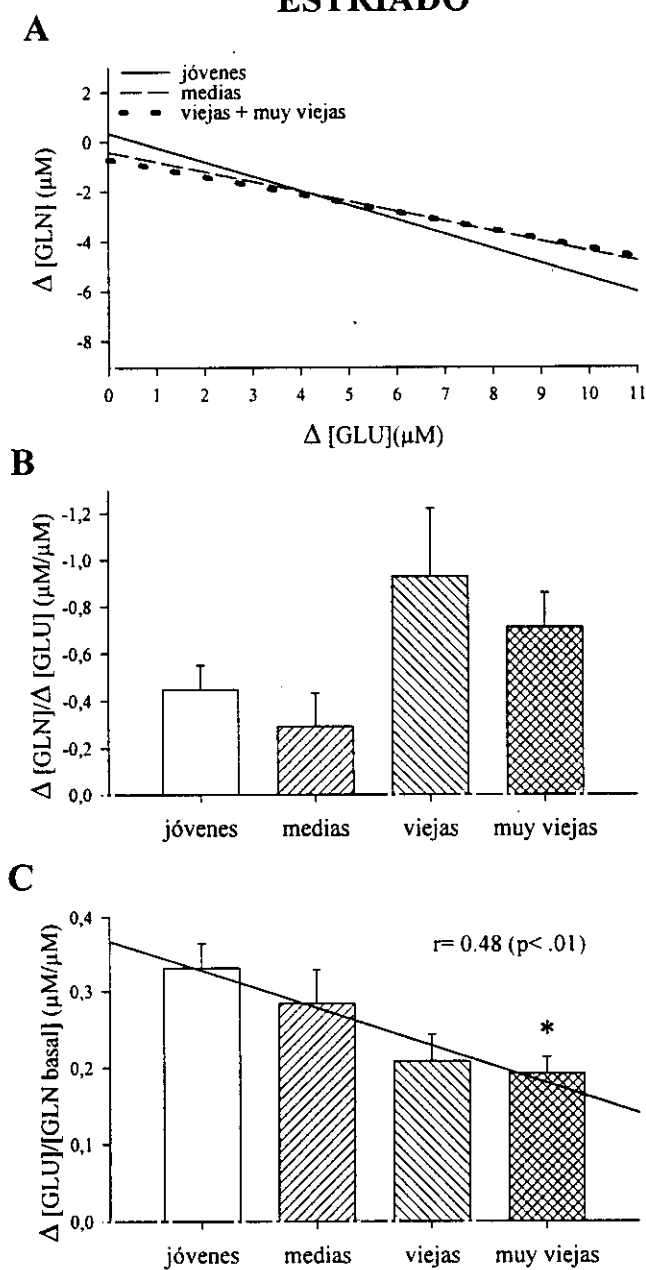
### Núcleo accumbens

Al igual que en el estriado, no se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de regresión obtenidas en el núcleo accumbens para la relación entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato en los diferentes grupos de edad estudiados (Fig. 84A). Hay que señalar, además, que globalmente los descensos de glutamina no se correlacionaron con los incrementos de glutamina (el coeficiente de correlación parcial entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato independiente de la dosis de PDC para todos los datos en el estudio fue  $r = 0.23$  (n.s.)). Tampoco se encontraron diferencias en los cocientes entre los descensos de glutamina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) en los diferentes grupos de edad (Fig. 84B), aunque, al igual que en el estriado, aunque se observó una gran variabilidad en los resultados.

Como en el estriado, se observó una tendencia significativa del cociente entre los incrementos de glutamato y la concentración basal de glutamina (PDC 4 mM) a disminuir con la edad ( $r = 0.28$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 84C).

## Resultados

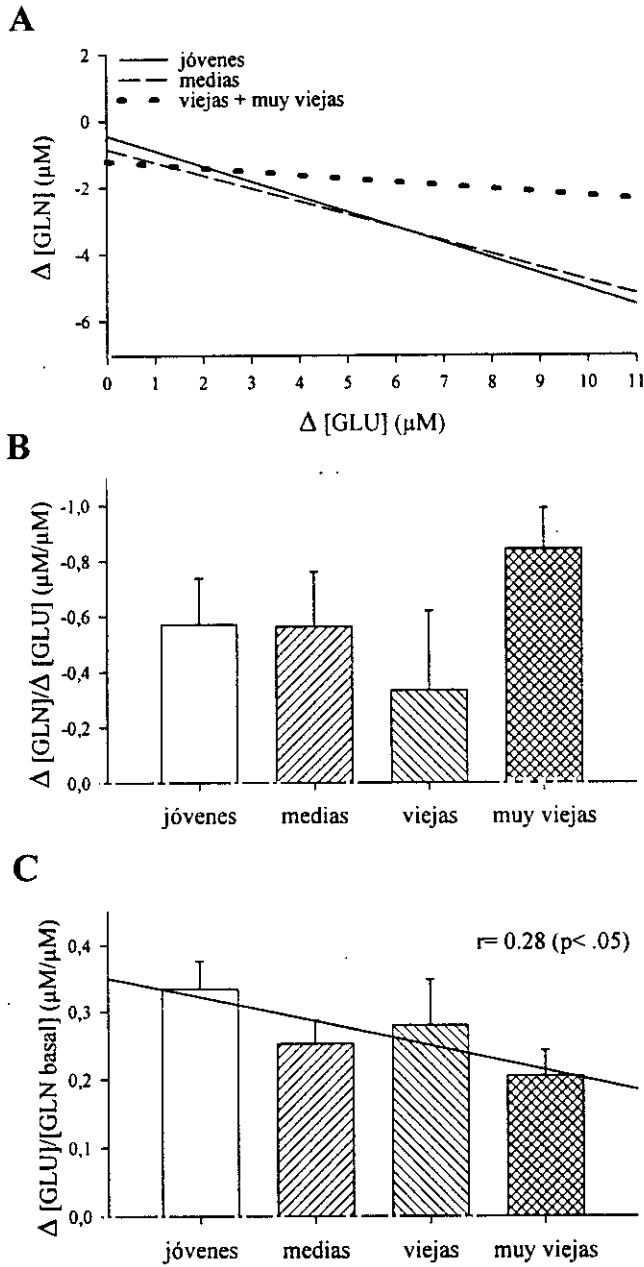
### ESTRIADO



**Figura 83:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de glutamina en el estriado de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los incrementos de glutamina. (B) cociente entre los incrementos de glutamina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM). (C) cociente entre los incrementos de glutamina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM) (\*  $p < 0.05$  comparado con ratas jóvenes).

Resultados

N. ACCUMBENS



**Figura 84:** Efecto del envejecimiento sobre las acciones del PDC en la concentración extracelular de glutamina en el núcleo accumbens de la rata despierta. (A) correlación entre los incrementos de glutamato y los incrementos de glutamina. (B) cociente entre los incrementos de glutamina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM). (C) cociente entre los incrementos de glutamina y los incrementos de glutamato (PDC 4 mM).

## *DISCUSIÓN*

## 1. ACERCA DEL USO DE LA MICRODIÁLISIS Y LOS BLOQUEANTES ESPECÍFICOS DEL TRANSPORTE PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES

Como se ha mostrado en la sección de "Resultados", la perfusión local de PDC a través de la cánula de microdiálisis en el estriado y el núcleo accumbens de la rata despierta incrementó la concentración extracelular de glutamato, así como la de los neurotransmisores dopamina y GABA. Los incrementos en la concentración de dopamina y GABA se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato independientemente de la dosis de PDC utilizada, sugiriendo que el glutamato es el responsable de los incrementos de dopamina y GABA. Esto se ve reforzado por el hecho de que el tratamiento con antagonistas de receptores glutamatérgicos atenúa los incrementos de dopamina y GABA. Por tanto, el uso de un bloqueante selectivo del transportador de alta afinidad para el glutamato (PDC), combinado con la técnica de microdiálisis en el animal despierto, ha mostrado ser una buena aproximación para el estudio de la interacción *in vivo* entre el glutamato endógeno y otros sistemas de neurotransmisores en circuitos específicos del cerebro.

### 1.1. Microdiálisis e interacción de neurotransmisores

En las últimas décadas se ha extendido el uso de la microdiálisis para el estudio de la neuroquímica cerebral (ver revisión en (Benveniste, 1989; Osborne et al., 1991; Gardner et al., 1993; Westerink, 1995)). Esta técnica permite el análisis de las sustancias presentes en el líquido extracelular a través de la implantación de una cánula de perfusión en el área cerebral que se desea estudiar. El diseño de la cánula de microdiálisis consiste, básicamente, en un sistema de cánulas (concéntricas o paralelas) a través del cual fluye el líquido de perfusión, y que presenta una membrana dialítica en el extremo en contacto con el tejido nervioso (Benveniste, 1989; Osborne et al., 1991; Westerink y Justice, 1991). La cánula de microdiálisis pretende imitar la función del capilar sanguíneo, de forma que el contenido del perfundido refleje la composición del líquido extracelular (Osborne et al., 1991). Su sensibilidad depende principalmente de las características de la membrana de diálisis (longitud, tamaño de poro) y del flujo de perfusión, parámetros que se relacionan directamente con la "recuperación" de sustancias desde el líquido extracelular al líquido de perfusión (Benveniste, 1989; Osborne et al., 1991). Las cánulas de microdiálisis utilizadas en el presente trabajo de investigación han sido construidas y diseñadas en nuestro propio taller, y sus características (dimensiones, membrana) están dentro de las descritas en la bibliografía (Segovia et al., 1997).

En cuanto al diseño del experimento de microdiálisis (ver sección de "Resultados") el objetivo principal fue trabajar en las condiciones más fisiológicas posibles. En primer lugar, los experimentos se realizaron en el animal despierto, con lo cual se evitan los efectos descritos de la anestesia sobre la neuroquímica cerebral (Moghaddam y Bolinao, 1994; Petrincic et al., 1996; Garris et al., 1997). Además todos los experimentos se realizaron en la fase oscura del ciclo luz/oscuridad, es decir, en el periodo de actividad del animal, ya que si bien no se realizaron estudios

## Discusión

comportamentales, esta bien descrita la existencia de un circadiano tanto en la actividad neuronal como en la concentración de neurotransmisores (Paulson y Robinson, 1994; Kanterewicz et al., 1995; Mitsushima et al., 1996; Rueter y Jacobs, 1996; Márquez de Prado et al., 1998). Por último, en la elección del resto de parámetros, como el flujo de perfusión o el momento de inserción de la cánula y del comienzo de recogida de muestras, se intentó optimizar tanto la "recuperación", y por tanto la sensibilidad, de la cánula como el volumen de muestra necesario para el análisis cromatográfico, así como minimizar algunos de los limitantes descritos de la técnica (recuperación del animal tras la cirugía estereotáxica, efecto drenaje a flujos de perfusión elevados, variaciones en la neuroquímica del tejido según la composición iónica del líquido de perfusión, alteraciones en determinados parámetros de la fisiología del tejido tras la inserción de la cánula, gliosis alrededor de la membrana dialítica tras varios días de la inserción de la cánula) (Benveniste, 1989; Osborne et al., 1991; Westerink y Justice, 1991).

El uso de la microdiálisis para el estudio de la interacción de neurotransmisores se ha combinado con el tratamiento, local o sistémico, con agonistas y antagonistas selectivos de receptores. En el caso del glutamato, esta aproximación ha permitido profundizar en el estudio de los efectos de la activación de diferentes clases de receptores sobre otros sistemas neurotransmisores en áreas específicas del cerebro (ver revisión en (Ruzicka y Jhamandas, 1993)). Sin embargo, el uso de agonistas nos da sólo una información parcial sobre el efecto del neurotransmisor endógeno tras activación de su liberación, e incluso puede llevar a conclusiones contradictorias si se estudia sólo los efectos de un agonista específico para investigar la interacción del neurotransmisor endógeno con otros neurotransmisores. Por ejemplo, la perfusión en el estriado de un agonista dopaminérgico del tipo D1 (SKF 38393) incrementa la concentración extracelular de GABA (Reid et al., 1990; You et al., 1994), mientras que la perfusión de un agonista del tipo D2 (pergolide) la reduce (Reid et al., 1990). Por el contrario, la perfusión local de un agonista mixto D1-D2, la apomorfina, que simularía las acciones de la dopamina endógena, incrementa la concentración extracelular de GABA en el estriado (Reid et al., 1990). En experimentos recientes de nuestro laboratorio, utilizando la misma aproximación experimental que la descrita en esta Tesis Doctoral (perfusión local de un bloqueante del transportador de dopamina, la nomifensina), hemos observado que un aumento de la concentración de dopamina endógena se correlaciona con incrementos de la concentración de GABA, siendo estos últimos incrementos atenuados con antagonistas de receptores dopaminérgicos (Expósito et al., 1999).

Otro problema del uso de agonistas específicos para el estudio de la interacción de neurotransmisores es la extrapolación de estos efectos a las acciones fisiológicas del neurotransmisor endógeno. Por ejemplo, la perfusión en el hipocampo de un agonista glutamatérgico, kainato, a través de la cánula de microdiálisis inhibe la liberación de GABA y como consecuencia la efectividad de la inhibición sináptica GABAérgica en el hipocampo (Rodríguez-Moreno et al., 1997), sugiriéndose que un incremento de la concentración de glutamato comprometería la función GABAérgica y conduciría a actividad epiléptica y excitotoxicidad. Sin embargo, los experimentos recientes de Obrenovitch et al. han mostrado que un aumento de la concentración extracelular de glutamato en el hipocampo *in vivo* (tras



## Discusión

bloqueo de su recaptura con PDC) no se sigue de una excesiva excitación (Obrenovitch et al., 1996).

### 1.2. Estudios sobre el glutamato endógeno con la técnica de microdiálisis.

De lo expuesto arriba se concluye que una información más fisiológica sobre la interacción entre neurotransmisores en circuitos específicos nos la daría el estudio de las acciones del propio neurotransmisor endógeno en dichos circuitos. Un aproximación experimental al estudio de las acciones del neurotransmisor endógeno sería la perfusión de éste a través de la cánula de microdiálisis. Para el caso del glutamato, esta aproximación ya ha sido utilizada para el estudio de su interacción con la dopamina en el estriado y el núcleo accumbens (Shimizu et al., 1990; Moghaddam et al., 1990; Youngren et al., 1993). El principal limitante de esta aproximación es que no permite estimar la concentración extracelular efectiva (mucho menor que la concentración en el líquido de perfusión) de glutamato que está teniendo efecto sobre la liberación de dopamina, y por tanto impide "cuantificar" la relación entre glutamato y dopamina, lo cual nos daría un parametro objetivo para el estudio comparativo de esta relación en diferentes grupos de edad (objetivo principal de este trabajo de investigación).

Como acabo de indicar, la principal ventaja del uso de un bloqueante del transportador de glutamato (PDC) para aumentar la concentración del glutamato endógeno, es que nos permite "cuantificar" la interacción entre el glutamato endógeno y otros neurotransmisores, como la dopamina y el GABA. Para ello, se utilizaron dos variables con las que se estudió los posibles cambios de estas interacciones a lo largo del envejecimiento: por un lado la pendiente de la recta de regresión lineal obtenida para la relación entre las variaciones en la concentración extracelular de dopamina y GABA (y el resto de sustancias medidas) y los incrementos de la concentración de glutamato tras perfusión con PDC (1-4 mM); y el cociente entre los incrementos de dopamina y GABA y los incrementos de glutamato para los máximos incrementos de glutamato (PDC 4 mM). El uso de bloqueantes del transporte para estudiar la interacción entre glutamato y dopamina en el estriado *in vivo* ya ha sido descrito previamente (Kondoh y Low, 1994), pero esta es la primera vez que se correlacionan las variaciones de la concentración de dopamina (y GABA) con los incrementos de la concentración de glutamato.

Una cuestión importante es si los incrementos en la concentración de glutamato descritos en este trabajo de investigación, y por tanto los efectos de estos incrementos sobre la concentración de dopamina y GABA, son de naturaleza fisiológica. La máxima concentración de glutamato alcanzada a la dosis de PDC 4 mM (en ratas jóvenes) fue de  $5.39 \pm 0.70 \mu\text{M}$  en el estriado y de  $4.06 \pm 0.42 \mu\text{M}$  en el núcleo accumbens. Esta concentración correspondería a una concentración extracelular (tras corrección con la "recuperación" *in vitro* de la cánula de microdiálisis) de 60-70  $\mu\text{M}$  en el estriado y 40-50  $\mu\text{M}$  en el núcleo accumbens. Estos valores están de acuerdo con la afinidad de los receptores ionotrópicos por el glutamato (rango micromolar) (Sands y Barish, 1989; Clements, 1996), y con la concentración de hasta 2.7 mM de glutamato que se ha estimado se alcanza en la

sinapsis (Clements, 1996). Junto a las acciones sinápticas del glutamato, se ha sugerido la posibilidad de acciones de tipo extrasináptico a través de la difusión o "spill-over" del glutamato desde su sitio de liberación hasta receptores localizados fuera de la sinápsis (Kullmann et al., 1996; Scanziani et al., 1997). En esta situación la concentración de glutamato que alcanzaría estos receptores extrasinápticos estaría en el rango micromolar. Por tanto, se puede concluir que los valores de concentración de glutamato obtenidos en este estudio se sitúan dentro de los rangos fisiológicos, y por tanto las interacciones descritas utilizando la aproximación experimental de este trabajo pueden ser consideradas también de naturaleza fisiológica.

### **1.3. PDC y concentración extracelular de glutamato: efecto del envejecimiento y de antagonistas de receptores glutamatérgicos**

El bloqueante del transportador de alta afinidad de glutamato usado en el presente trabajo de investigación, PDC, es un análogo transportable del glutamato que produce una inhibición del transporte de glutamato muy selectiva y potente sin interferir en la unión del glutamato a sus receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos (Bridges et al., 1991; Thomsen et al., 1994; Kanai et al., 1994; Balcar et al., 1995). Se ha descrito recientemente que el PDC puede inducir también la salida de glutamato del interior celular a través de un proceso de heterointercambio que contribuiría a la acumulación extracelular de glutamato (Waldmeier et al., 1993; Thomsen et al., 1994; Volterra et al., 1996; Blitzblau et al., 1996). En estudios preliminares de nuestro laboratorio hemos mostrado que la perfusión intracerebral del PDC incrementa la concentración extracelular de glutamato (Segovia et al., 1997; Del Arco y Mora, 1997). Estos resultados también han sido descritos por varios autores en diferentes áreas cerebrales (Massieu et al., 1995; Bloc et al., 1995; Obrenovitch et al., 1996; Massieu y Tapia, 1997; Lada et al., 1998). Por otro lado, la perfusión en el estriado de PDC a través de la cánula de microdiálisis en concentraciones de hasta 100 mM no produce daños neurotóxicos en el tejido perfundido (Massieu et al., 1995). Es más, la perfusión en el hipocampo de 10 mM de PDC, también a través de la cánula de microdiálisis, no produce cambios electrofisiológicos indicadores de una excesiva excitación, a pesar de incrementar la concentración de glutamato más de 20 veces (Obrenovitch et al., 1996). Por tanto, gracias a su especificidad y ausencia de toxicidad, la perfusión local de PDC en el estriado y el núcleo accumbens nos permite investigar las acciones del glutamato endógeno, a través de sus receptores, sobre otros sistemas de neurotransmisores.

Los incrementos de la concentración de glutamato producidos por el PDC fueron atenuados por el tratamiento con un antagonista de receptores AMPA/kainato tanto en el estriado como en el núcleo accumbens. Estos resultados han sido previamente descritos en la literatura (Bloc et al., 1995; Rawls y McGinty, 1997) y sugieren la existencia de procesos autoreguladores presinápticos a través de receptores glutamatérgicos del tipo AMPA/kainato (Bloc et al., 1995). De forma alternativa, se ha sugerido también que el aumento de la concentración de glutamato activa vías transinápticas de retroalimentación positiva cuya consecuencia final sería

## Discusión

una potenciación de la liberación de glutamato desde las terminales corticoestriatales (Rawls y McGinty, 1997).

Como se ha descrito en la sección de "Resultados", los incrementos de la concentración de glutamato producidos por el PDC en el estriado, pero no en el núcleo accumbens, fueron menores en el grupo de ratas de edad media, vieja y muy vieja comparadas con ratas jóvenes, existiendo además una tendencia significativa de los incrementos de glutamato a disminuir con la edad. Estos resultados sugieren que la actividad del transportador de alta afinidad de glutamato en el estriado disminuye durante el envejecimiento. Diferentes estudios han mostrado una reducción del transporte neuronal de glutamato en el estriado debido a una pérdida de sitios de transporte (Price et al., 1981; Najlerahim et al., 1990), aunque otros estudios han mostrado una ausencia de cambios (Palmer et al., 1994) e incluso aumentos (Strong et al., 1984). Por otro lado, las reducciones en el número de transportadores neuronales puede estar compensado tanto por un aumento en la afinidad (Price et al., 1981) como por el aumento en el número de astrocitos y por tanto del transporte astrocitario de glutamato (Brizzee et al., 1983; Terry, 1986; David et al., 1997). Dado el efecto del antagonista de receptores AMPA/kainato descrito aquí, es difícil determinar si las disminuciones en el aumento de glutamato son enteramente debidas a cambios en la capacidad de transporte. Además, como se discute más adelante, los incrementos de la concentración de glutamato producidos por el PDC pueden ser utilizados como un índice de la síntesis de glutamato a partir de glutamina. Por último, en un reciente estudio *in vivo* utilizando la técnica de microdiálisis, la perfusión local de PDC (100 mM) en el estriado produjo un incremento de la concentración de glutamato casi dos veces mayor en ratas de edad vieja que en ratas jóvenes (Massieu y Tapia, 1997). Aunque las variaciones en el diseño (dosis de PDC, animal anestesiado) puedan explicar las diferencias entre estos últimos resultados y los obtenidos en el presente trabajo, el conjunto de datos discutidos no permite concluir acerca del efecto del envejecimiento sobre el transportador de glutamato en el estriado.

## 2. ACERCA DE LA INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN EL ESTRIADO Y EL NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS JOVENES

Como se ha discutido en la sección anterior, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral sugieren la existencia de una interacción entre los neurotransmisores glutamato, dopamina y GABA en el estriado y el núcleo accumbens de la rata despierta. También parece existir una gran relación entre los incrementos de la concentración de glutamato y los aumentos de taurina, así como con los descensos de los metabolitos de la dopamina DOPAC y HVA, y del precursor de glutamato y GABA, la glutamina. A continuación se discuten estas interacciones a la luz de la bibliografía sobre la sinaptología y la neuroquímica que del estriado y el núcleo accumbens ha sido publicada.

### 2.1. Interacción glutamato/dopamina

El incremento de la concentración extracelular de dopamina se correlaciona positivamente con el incremento de la concentración de glutamato tanto en el estriado como en el núcleo accumbens. Los incrementos de la concentración de dopamina se atenúan con el tratamiento con antagonistas de receptores glutamatérgicos del tipo NMDA, y, probablemente (si se extrapola de los resultados en los metabolitos DOPAC y HVA), del tipo AMPA/kainato. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos mostrando la facilitación de la liberación de dopamina por agonistas glutamatérgicos tanto *in vitro* como *in vivo* (ver revisión en (Ruzicka y Jhamandas, 1993)).

La perfusión local, a través de la cánula de microdiálisis, de agonistas glutamatérgicos del tipo NMDA y AMPA/kainato en el estriado y el núcleo accumbens incrementa la concentración extracelular de dopamina (Imperato et al., 1990; Keefe et al., 1992; Westerink et al., 1992; Morari et al., 1993; Whitton et al., 1994; Ohno y Watanabe, 1995; Kendrick et al., 1996; Smolders et al., 1996; Segovia y Mora, 1998). También se ha descrito un aumento de la liberación de dopamina tras perfusión en el estriado de agonistas metabotrópicos (Arai et al., 1996; Verma y Moghaddam, 1998). Los datos sobre el efecto de los agonistas metabotrópicos en el núcleo accumbens son más controvertidos, habiéndose descrito tanto aumentos (Ohno y Watanabe, 1995; Taber y Fibiger, 1995) como disminuciones (Taber y Fibiger, 1995; Hu et al., 1998) en la concentración de dopamina. Más interesantes son, sin embargo, los estudios en los que la perfusión con el propio glutamato tanto en el estriado como en el núcleo accumbens incrementó la concentración extracelular de dopamina (Shimizu et al., 1990; Moghaddam et al., 1990; Youngren et al., 1993). Estos últimos datos están en la línea de los resultados descritos en esta Tesis Doctoral, y confirman el efecto facilitador del glutamato sobre la liberación de dopamina en el estriado y el núcleo accumbens.

Dado que no se ha descrito la existencia de contactos sinápticos entre las aferencias glutamatérgicas y dopamérgicas al estriado y el núcleo accumbens, la acción facilitadora de la liberación de dopamina por parte del glutamato está probablemente mediada por una acción extrasináptica del glutamato sobre las

## *Discusión*

terminales dopaminérgicas. Una característica importante de las aferencias glutamatérgicas y dopaminérgicas al estriado y el núcleo accumbens es que convergen sobre las mismas espinas dendríticas de neuronas GABAérgicas de proyección (Bouyer et al., 1984; Freund et al., 1984; Sesack y Pickel, 1990; Sesack y Pickel, 1992), por lo que estarían lo suficientemente próximas como para que el glutamato difundiera desde su punto de liberación hasta las terminales dopaminérgicas. Por otro lado existe evidencia tanto farmacológica como histoquímica de la existencia de receptores glutamatérgicos sobre las terminales dopaminérgicas (Desce et al., 1991; Krebs et al., 1991; Tarazi et al., 1998). Por tanto, estos datos sugieren la posibilidad de que la interacción entre glutamato y dopamina sea de tipo extrasináptico o volumétrico. Este tipo de acciones del glutamato a través de su difusión desde la sinapsis hasta heteroreceptores presinápticos ya se ha descrito en otras áreas, asignándole un importante papel funcional (Kullmann et al., 1996; Scanziani et al., 1997).

No se puede descartar, sin embargo, que la acción del glutamato sobre la concentración extracelular de dopamina sea indirecta, a través de circuitos neuronales, ya que se ha descrito que las acciones facilitadoras de agonistas glutamatérgicos sobre la liberación de dopamina en el estriado y el núcleo accumbens son parcialmente dependientes de TTX, y por tanto de la conducción del impulso nervioso en neuronas (Westerink et al., 1992; Morari et al., 1993; Youngren et al., 1993). Se ha descrito además, que los agonistas glutamatérgicos inducen la liberación de acetilcolina (Ruzicka y Jhamandas, 1993; Kendrick et al., 1996), la cual, por su parte, puede incrementar la concentración de dopamina (Desce et al., 1991; Smolders et al., 1997). Por último, es posible también la mediación del óxido nítrico, cuyas acciones neuromoduladoras han sido recientemente descritas, en las acciones del glutamato sobre la dopamina (Hanbauer et al., 1992; Segovia et al., 1994; Kendrick et al., 1996; Segovia y Mora, 1998).

Por otro lado, el tratamiento con un antagonista glutamatérgico del tipo NMDA aumentó la concentración de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA en el núcleo accumbens pero no en el estriado, sugiriendo la existencia en el núcleo accumbens de un control inhibitor tónico de la liberación de dopamina a través de receptores NMDA. Diferentes autores han sugerido la existencia de un control glutamatérgico inhibitor indirecto sobre la liberación de dopamina a través de interneuronas GABAérgicas o de neuronas GABAérgicas que proyectan a sustancia negra y área ventrotectal (Barbeito et al., 1990; Leviel et al., 1990; Krebs et al., 1993; Smolders et al., 1995). Por tanto, el bloqueo de receptores del tipo NMDA podría liberar de este control inhibitor indirecto del glutamato sobre la liberación de dopamina.

Existen varias evidencias que sugieren que la interacción entre glutamato y dopamina en el estriado y el núcleo accumbens puede jugar un importante papel funcional en el control de la actividad motora. Por una parte, se ha sugerido la existencia de una interacción entre glutamato y dopamina en los ganglios basales que estaría implicada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Carlsson y Carlsson, 1990; Greenamyre, 1993). En concreto, Carlsson et al. han mostrado que la inyección de antagonistas glutamatérgicos tanto en el estriado como en el núcleo

## Discusión

accumbens de ratones reserpinizados (un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson) estimula la actividad locomotora (Carlsson et al., 1992). Por otro lado, se ha descrito que la administración local de agonistas glutamatérgicos en el estriado y el núcleo accumbens tiene importantes efectos motores que parecen estar mediados por la dopamina (Sacaan et al., 1992; Svensson et al., 1994; Queen et al., 1998). El papel que jugaría esta interacción glutamato/dopamina en el control del comportamiento motor podría ser el de contribuir a la formación y mantenimiento de una unión entre la información sensorial y emocional que llega al estriado y el núcleo accumbens, respectivamente, a través de la aferencia glutamatérgica, y la información motora proveniente de los sistemas ascendentes dopaminérgicos.

### 2.2. Interacción glutamato/GABA

Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran la existencia de una correlación positiva entre los incrementos de la concentración de GABA y glutamato tanto en el estriado como en el núcleo accumbens, sugiriendo que el glutamato induce el aumento de la concentración de GABA. Para nuestro conocimiento estos resultados son los primeros en la bibliografía mostrando una interacción entre glutamato y GABA en el núcleo accumbens *in vivo*. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos mostrando la facilitación de la liberación de GABA por agonistas glutamatérgicos en diferentes áreas cerebrales (ver revisión en (Ruzicka y Jhamandas, 1993)), así como con la presencia de receptores glutamatérgicos en neuronas GABAérgicas del estriado y el núcleo accumbens. (Chen et al., 1996; Tarazi et al., 1998). La existencia, además, de contactos sinápticos directos entre las terminales glutamatérgicas y las neuronas GABAérgicas, tanto interneuronas como de proyección, sugiere que el incremento de GABA puede ser atribuido a una acción directa del glutamato. Por otro lado, se ha descrito que los astrocitos pueden liberar GABA (Attwell et al., 1993), y que estos poseen además receptores glutamatérgicos (Steinhäuser y Gallo, 1996), por lo que es posible que los astrocitos estén participando también en los aumentos de la concentración de GABA producidos por el glutamato.

En el estriado, los incrementos de la concentración de GABA se atenúan significativamente con el tratamiento con el antagonista de receptores glutamatérgicos del tipo AMPA/kainato, pero no con el antagonista de receptores del tipo NMDA (aunque se observó una reducción no significativa), sugiriendo que los incrementos de GABA están principalmente mediados por activación de receptores AMPA/kainato. Estos resultados contrastan con los obtenidos por diferentes estudios *in vivo* mostrando un aumento de la concentración extracelular de GABA tras la perfusión local de agonistas tanto del tipo NMDA como del tipo AMPA/kainato (Morari et al., 1993; Young y Bradford, 1993; Kendrick et al., 1996; Bianchi et al., 1996; Segovia y Mora, 1998). Estos datos sugieren que el efecto del glutamato endógeno sobre la concentración extracelular de GABA, que resulta del balance de sus acciones sobre receptores NMDA, AMPA/kainato y metabotrópicos (de los cuales no se dispone información), es específico del área cerebral estudiada.

## Discusión

Por su parte, los datos obtenidos en el núcleo accumbens con los antagonistas glutamatérgicos son más confusos: el tratamiento con el antagonista NMDA incrementó la concentración extracelular basal de GABA y potenció los incrementos de GABA inducidos por el glutamato, mientras que el antagonista AMPA/kainato no tuvo ningún efecto, sugiriendo la existencia de una modulación inhibitoria del glutamato sobre la liberación de GABA a través de receptores NMDA. Estos resultados contrastan tanto con el efecto facilitador de la liberación de GABA de los agonistas ionotrópicos glutamatérgicos en el estriado, como con el hecho de que la aplicación local de agonistas glutamatérgicos induce aumentos de la actividad de neuronas estriatales y del núcleo accumbens (Cepeda et al., 1996; Kiyatkin y Rebec, 1996). Dado que el efecto final del glutamato fue aumentar la concentración de GABA, estos resultados sugieren que este efecto final se debe a la existencia de un balance entre las acciones del glutamato sobre todos sus receptores (por desgracia no existe información en la bibliografía sobre estas acciones). En cualquier caso se pone de manifiesto una vez más la necesidad de estudiar el efecto del glutamato endógeno para obtener una información completa sobre las acciones de éste sobre otros sistemas de neurotransmisores. Teniendo en cuenta esto, se puede concluir que el efecto neto de la activación de receptores glutamatérgicos en el núcleo accumbens tiene un efecto facilitador de la liberación de GABA. Para nuestro conocimiento, estos son los primeros resultados en la bibliografía describiendo la interacción glutamato/GABA *in vivo* en el núcleo accumbens.

Dada la acción sináptica inhibitoria del GABA en el estriado (Kita, 1993), el papel que podría jugar esta interacción glutamato/GABA podría ser el de proveer de una modulación al control inhibitorio que el GABA puede estar ejerciendo dentro de los circuitos sinápticos locales del estriado y el núcleo accumbens. Este control inhibitorio del GABA puede estar mediado tanto por interneuronas GABAérgicas como por las colaterales de las neuronas de proyección, que sinaptan con neuronas de proyección laterales (Freund et al., 1984; Smith y Bolam, 1990; Kita, 1993), las cuales controlarían principalmente los patrones de actividad de las neuronas de proyección del estriado y el núcleo accumbens (Kita, 1993). Por otro lado, el GABA puede estar ejerciendo acciones moduladoras de la liberación de neurotransmisores como la dopamina (Bowery et al., 1980; Santiago et al., 1993; Smolders et al., 1995), por lo que la interacción glutamato/GABA podría controlar también la actividad de otros sistemas neurotransmisores en el estriado y el núcleo accumbens.

### 2.3. Interacción glutamato/taurina

Como se ha mostrado en la sección de "Resultados", los incrementos de la concentración de taurina se correlacionan significativamente con los incrementos de la concentración de glutamato tanto en el estriado como en el núcleo accumbens. La perfusión con un antagonista de receptores del tipo NMDA atenuó los incrementos de taurina en el estriado pero no en el núcleo accumbens, mientras que la perfusión con un antagonista de receptores AMPA/kainato atenuó los incrementos de taurina en ambas estructuras. Estos resultados están en consonancia con el aumento de la concentración extracelular de taurina que producen los agonistas glutamatérgicos en

## *Discusión*

el estriado (Shibanoki et al., 1993; Bianchi et al., 1996) y en otras áreas cerebrales (Menéndez et al., 1990; Ruzicka y Jhamandas, 1993).

Diferentes estudios han descrito la presencia de taurina en neuronas y glía en múltiples áreas cerebrales (Palkovits et al., 1986; Huxtable, 1989). En el estriado, se ha sugerido la presencia de taurina en neuronas de proyección GABAérgica (Palkovits et al., 1986; Smith y Bolam, 1990; Della Corte et al., 1990; Bianchi et al., 1996). Por un lado, se ha descrito el transporte de taurina marcada en neuronas espinosas de tamaño mediano, que son neuronas GABAérgicas de proyección (Smith y Bolam, 1990; Della Corte et al., 1990). Por otro, la activación de neuronas estriatonigrales con kainato induce la liberación concomitante de GABA y taurina tanto en el estriado como en la sustancia negra (Bianchi et al., 1996). En el anterior estudio la liberación de GABA, pero no la de taurina, fue atenuada por la perfusión con TTX y DNQX, sugiriendo la existencia de diferentes mecanismos de liberación (Bianchi et al., 1996). De hecho se ha sugerido que la liberación de taurina en el hipocampo puede ocurrir desde sitios somatodendríticos antes que de las terminales nerviosas (Lehmann et al., 1985).

A pesar de la amplia distribución de la taurina en el cerebro, su función no se ha podido determinar claramente. La taurina posee una importante acción anticonvulsiva (Huxtable y Sebring, 1986; Huxtable, 1989), lo cual sugiere que podría actuar como modulador de la excitabilidad en el sistema nervioso. Esta acción de la taurina puede estar mediada por la inhibición de la liberación de neurotransmisores (Kuriyama, 1980; Arzate et al., 1986; Kamisaki et al., 1993), o por el control de las corrientes de  $Ca^{2+}$  y de  $Cl^-$  a través de la membrana (Huxtable y Sebring, 1986; Häusser et al., 1992). Por otro lado también se ha sugerido que la taurina podría actuar como osmorregulador en el cerebro (Huxtable y Sebring, 1986; Huxtable, 1989), función en la que podrían estar implicados los transportadores de taurina ya que responden a cambios en la osmolaridad (Beetsch y Olson, 1993). Se ha sugerido que podría existir un flujo dinámico de taurina durante la actividad neuronal para mantener los parámetros osmóticos dentro de un estrecho rango (Wade et al., 1988). Por tanto, la interacción glutamato/taurina serviría como mecanismo de retroalimentación negativa que controlaría los cambios en la excitación y la osmolaridad producido por el aumento de la actividad neuronal inducido por el glutamato.

### **2.4. Interacción glutamato/glutamina**

Los incrementos en la concentración de glutamato producido por el PDC se correlacionaron significativamente con la concentración extracelular basal de glutamina tanto en el estriado como en el núcleo accumbens (este efecto se hizo significativo cuando se calculó el coeficiente de correlación parcial entre los incrementos de glutamato independientemente de la dosis de PDC para todos los datos en el estudio). Este resultado sugiere que los incrementos de glutamato dependen de la concentración basal de glutamina, y esta en consonancia con el papel de la glutamina como precursor metabólico del glutamato (Bradford et al., 1978; Fonnum, 1993).



## Discusión

Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la síntesis de glutamato se deriva principalmente de la glutamina, y que tanto los incrementos como los disminuciones de la concentración extracelular de glutamina pueden correlacionarse con incrementos y disminuciones de glutamato (Bradford et al., 1978; Ward et al., 1983; Thanki et al., 1983; Paulsen et al., 1987; Bowyer et al., 1995). Debido a que la enzima que sintetiza la glutamina, la glutamina sintetasa, esta principalmente localizada en astrocitos (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979), mientras que la síntesis de glutamato ocurre en neuronas, existe un tráfico de glutamina y glutamato entre neuronas y astrocitos, que se ha venido en llamar "ciclo glutamato/glutamina" (Westergaard et al., 1995). Por tanto, la concentración extracelular de glutamina puede ser un indicador de este tráfico metabólico entre neuronas y astrocitos. Por otro lado, el PDC puede inducir la salida de glutamato del interior celular a través de un proceso de heterointercambio que contribuiría a la acumulación extracelular de glutamato (Waldmeier et al., 1993; Thomsen et al., 1994; Volterra et al., 1996; Blitza et al., 1996). De esta manera, el aumento de la concentración extracelular de glutamato producido por el PDC, puede ser en parte un reflejo del glutamato intracelular y, por tanto, de la síntesis de glutamato a partir de glutamina. De esta manera la relación entre los incrementos de glutamato y la concentración basal de glutamina podría ser un índice del estado del ciclo glutamato/glutamina en la rata despierta.

Junto al resultado anterior, en la sección de "Resultados" se muestra como la perfusión de PDC en el estriado y el núcleo accumbens produjo un descenso de la concentración extracelular de glutamina. Cuando se analizó este efecto en todos los datos en el estudio, los descensos de glutamina se correlacionaron significativamente con los incrementos de glutamato en el estriado pero no en el núcleo accumbens. Dado que los astrocitos poseen transportadores para el glutamato (Rothstein et al., 1996; Gegelashvili y Schousboe, 1998) y la síntesis de glutamina a partir de glutamato tiene lugar principalmente en astrocitos (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979), la reducción en la disponibilidad del sustrato para la síntesis de glutamina en el astrocito podría dar cuenta del descenso en la concentración de glutamina producida por el PDC. Si esta hipótesis fuera correcta, el tratamiento con antagonistas de receptores glutamatérgicos no debería afectar a los efectos del PDC sobre la concentración de glutamina. Sin embargo, los descensos de glutamina fueron atenuados por el tratamiento con antagonistas glutamatérgicos en ambas estructuras. En el estriado, además, el antagonista de los receptores AMPA/kainato, cuando se coperfundió con PDC, produjo un incremento significativo de la concentración de glutamina. Estos resultados sugieren la existencia de una modulación de la síntesis de glutamina por el glutamato a través de sus receptores. En cualquier caso, no se puede descartar que el bloqueo del transporte por el PDC pueda participar directamente en los descensos de glutamina a través de la reducción del glutamato intracelular disponible para la síntesis de glutamina, sobre todo en el núcleo accumbens, donde los descensos de glutamina no se correlacionaron con los incrementos de glutamato.

El glutamato puede regular la síntesis de glutamina en astrocitos a través principalmente de receptores AMPA/kainato, ya que existe gran evidencia de la

## Discusión

existencia de este tipo de receptores, pero no de receptores del tipo NMDA, en astrocitos (Teichberg, 1991; Steinhäuser y Gallo, 1996). Se ha descrito además que el kainato inhibe la síntesis de glutamina *in vitro* (Krespan et al., 1982), por lo que el glutamato puede ejercer una acción directa sobre la síntesis de glutamina a través de receptores AMPA/kainato. Esto podría explicar el aumento de la concentración de glutamina que el antagonista AMPA/kainato produjo en la concentración de glutamina tras estimulación con PDC en estriado y en condiciones basales en el núcleo accumbens. Sin embargo, también se ha descrito una disminución de la concentración de glutamina en el estriado tras perfusión local del agonista NMDA (Segovia y Mora, 1998), así como un incremento de la actividad de la glutamina sintetasa con el consecuente incremento del contenido de glutamina en el cerebro tras el tratamiento con antagonistas NMDA (Kosenko et al., 1994). Se ha sugerido además la participación del óxido nítrico en las acciones inhibitoras del NMDA sobre la síntesis de glutamina, de manera que la activación de los receptores NMDA induciría la síntesis de óxido nítrico que por su parte inhibiría la síntesis de glutamina (Kosenko et al., 1994; Kosenko et al., 1995; Miñana et al., 1997; Segovia y Mora, 1998). Por tanto, los resultados descritos en esta Tesis Doctoral sugieren la participación de receptores glutamatérgicos en la regulación de la glutamina extracelular, aunque queda por elucidar la participación específica de cada tipo de receptor.

### 3. ACERCA DEL EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA INTERACCIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN EL ESTRIADO Y EL NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA DESPIERTA

A continuación se discuten los efectos del envejecimiento en la interacción de neurotransmisores estudiada con la aproximación experimental descrita. También se discute sobre los efectos del envejecimiento en la concentración extracelular de aminoácidos y catecolaminas. Como se verá, el principal resultado de esta Tesis Doctoral es la existencia de un gradiente dorsoventral entre el estriado y el núcleo accumbens en los efectos del envejecimiento sobre la interacción entre glutamato y dopamina, y glutamato y GABA.

#### 3.1. Envejecimiento y concentración extracelular basal de aminoácidos y catecolaminas

Tanto en el estriado como en el núcleo accumbens, la concentración extracelular basal de los aminoácidos neurotransmisores glutamato y GABA, así como la de taurina, no varió en ninguno de los grupos de edad estudiado. Esta estabilidad ya ha sido descrita previamente en nuestro laboratorio tanto *in vivo* (Porras y Mora, 1995) como *in vitro* (Sánchez-Prieto et al., 1994). Aunque un reciente estudio *in vivo* ha mostrado ausencia de cambios en la concentración basal de GABA y taurina (Corsi et al., 1997), los resultados en la bibliografía respecto al glutamato son controvertidos, mostrando tanto ausencia de cambios (Saransaari y Oja, 1995), como aumentos (Freeman y Gibson, 1987; Massieu y Tapia, 1997) e incluso disminuciones (Corsi et al., 1997) de la concentración basal de glutamato. Recientemente, un estudio con microdiálisis ha descrito diferencias regionales en los cambios relacionados con la edad en la concentración de glutamato, con aumentos en el estriado lateral pero no en el medial (Donzanti et al., 1993). Aunque estas diferencias regionales podrían dar cuenta de la variabilidad en los resultados, hay que tener en cuenta la dificultad en la interpretación del significado fisiológico de la concentración basal de glutamato, y también GABA, medida con microdiálisis. Diferentes estudios han mostrado que esta concentración extracelular de glutamato y GABA es en gran medida independiente de TTX y de calcio, dos criterios clásicos para determinar el origen neuronal de un neurotransmisor (ver revisión en (Timmerman y Westerink, 1997)). Otros elementos celulares, en concreto la glía, pueden contribuir a la concentración extracelular de glutamato y GABA por lo que variaciones en la concentración de glutamato y GABA no parecen reflejar cambios en la liberación neuronal de glutamato. Sin embargo, se ha sugerido recientemente la posibilidad de una liberación de glutamato desde la glía en respuesta a estímulos fisiológicos a través de un mecanismo que implicaría la activación de receptores gliales (Miele et al., 1996), de manera que el incremento de la actividad neuronal podría ligarse al aumento de la concentración extracelular de glutamato desde fuentes no neuronales.

A diferencia del glutamato y el GABA, la concentración extracelular de dopamina si puede ser utilizado como un índice de la actividad basal de los sistemas dopaminérgicos. Como se muestra en la sección de resultados, la concentración

## Discusión

basal de dopamina en el núcleo accumbens fue menor en animales de edad media, vieja y muy vieja que en ratas jóvenes. Esta reducción estuvo acompañada de una tendencia significativa del metabolito HVA a ser menor con la edad. En el estriado no hubo diferencias en la concentración de dopamina entre los diferentes grupos de edad, aunque se observó una tendencia no significativa a aumentar. Estos resultados están de acuerdo con diferentes estudios *in vivo* con la técnica de microdiálisis mostrando reducciones en la concentración de dopamina con la edad en el núcleo accumbens (Huang et al., 1995) y no cambios en el estriado (Santiago et al., 1993; Kametani et al., 1995). Este efecto diferencial del envejecimiento sobre la concentración basal de dopamina es interesante dada la pérdida de neuronas en las áreas mesencefálicas de origen de las aferencias dopaminérgicas al estriado y núcleo accumbens (Sabel y Stein, 1981; Felten et al., 1992). La ausencia de cambios en el estriado podría ser debida a un aumento de la síntesis de dopamina en las neuronas nigroestriatales no afectadas por el envejecimiento que compensaría la pérdida neuronal asociada a la edad (Greenwood et al., 1991). Tanto si los cambios son debidos a diferencias en la síntesis de dopamina o a la diferencia en la liberación de dopamina, los resultados sugieren la existencia de un gradiente dorsoventral en los cambios en la concentración extracelular de dopamina. Sin embargo, estos cambios no nos permiten valorar el estado funcional de circuitos específicos del cerebro ya que no nos informan sobre la interacción de diferentes sistemas neurotransmisores en estos circuitos.

La concentración extracelular de glutamina en el núcleo accumbens, pero no en el estriado, fue mayor en ratas de edad media, vieja y muy vieja, existiendo además una tendencia significativa a ser mayor con la edad. Similares aumentos han sido descritos por nuestro laboratorio en corteza (Cobo et al., 1992). Dado que se han descrito importantes reducciones neuronales en corteza prefrontal (Fornieles et al., 1986; Dawson, Jr. et al., 1989; Wallace y Dawson, Jr., 1990), principal área de origen de las aferencias glutamatérgicas al núcleo accumbens, estos aumentos en la glutamina pueden ser la expresión de mecanismos de compensación para matener los niveles basales de glutamato. Ya que la síntesis de glutamina tiene lugar principalmente en el astrocito (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979), esta hipótesis está de acuerdo con el incremento del número de células gliales que tiene lugar durante el envejecimiento (Brizze et al., 1983; Terry, 1986; David et al., 1997). Por otro lado, la relación entre los incrementos de glutamato producidos por el PDC y la concentración extracelular de glutamina fue distinta en los distintos grupos de edad estudiado tanto en el estriado como en el núcleo accumbens, de manera que el cociente entre los incrementos de glutamato y la concentración de glutamina tendió significativamente a ser menor con la edad. Como se ha discutido más arriba, estos resultados sugieren que la síntesis de glutamato a partir de glutamina se reduce con la edad, lo cual se ve reflejado también en la reducción con la edad en los aumentos de glutamato producidos por el PDC en el estriado. La ausencia de cambios con la edad en los aumentos de glutamato en el núcleo accumbens podría ser debido precisamente al aumento en la concentración de glutamina. El conjunto de estos resultados sugiere que el ciclo de síntesis de glutamato a partir de glutamina se ve alterado con la edad tanto en el estriado como en el núcleo accumbens de la rata despierta.

### 3.2 Envejecimiento e interacción de neurotransmisores

Como ya se ha descrito más arriba, la interacción entre glutamato y dopamina en el estriado de la rata despierta no sufre cambios en animales de edad vieja comparados con animales jóvenes. Sin embargo, en ratas de edad media, los aumentos de la concentración de dopamina producidos por el glutamato son mayores que en ratas jóvenes. La interacción entre glutamato y GABA en el estriado no varía en ninguno de los grupos de edad estudiados. Por su parte, la interacción entre dopamina y glutamato en el núcleo accumbens sufre modificaciones en los diferentes grupos de edad estudiados de manera que los aumentos de dopamina producidos por el glutamato tienden significativamente a ser menores con la edad. Por el contrario, la interacción entre glutamato y GABA parece cambiar con la edad en el sentido opuesto, es decir, la capacidad del glutamato para incrementar la concentración de GABA tiende a aumentar de forma significativa con la edad. Como contraste, la interacción entre glutamato y taurina, que tendría funciones más inespecíficas, no se ve alterada ni en el estriado ni en el núcleo accumbens. Estos resultados son la primera aproximación en la bibliografía al estudio de la interacción entre glutamato y dopamina en circuitos específicos de la rata despierta, y sugieren la existencia de un gradiente dorsoventral entre el estriado y el núcleo accumbens en los efectos del envejecimiento sobre la interacción entre glutamato y dopamina.

Diferentes estudios han descrito la existencia de gradientes dorsoventrales entre el estriado y el núcleo accumbens en los efectos del envejecimiento sobre diferentes parámetros neuroquímicos relacionados con la transmisión dopaminérgica en el estriado. Crawford y Levine han mostrado, por ejemplo, que la reducción en ratas de edad vieja de la expresión de Fos, un marcador de actividad neuronal, tras estimulación con amfetamina o con agonistas dopaminérgicos (quinpirole), es mayor en el núcleo accumbens que en el estriado, donde no se obtuvieron cambios significativos (Crawford y Levine, 1997). Más interesantes son los estudios de Friedemann y Gerhardt, en los que la reducción con la edad de la cantidad de dopamina liberada *in vivo* tras estimulación con potasio sigue también un gradiente dorsoventral con reducciones más pronunciadas y tempranas (aparecen ya en ratas de edad media) en el núcleo accumbens (Friedemann y Gerhardt, 1992). Estos resultados sugieren además que los cambios diferenciales de la respuesta de dopamina a la estimulación con glutamato que se describen en esta Tesis Doctoral pueden ser debidos a un deterioro diferencial de los mecanismos de liberación de dopamina. Esta hipótesis está de acuerdo con otros estudios utilizando la técnica de microdiálisis en los que se muestra tanto en el estriado como en el núcleo accumbens una reducción con la edad de la liberación de dopamina tras infusión local de amfetamina, que actúa principalmente sobre el transportador de dopamina (Huang et al., 1995; Kametani et al., 1995), sin cambios en estriado en la liberación de dopamina tras estimulación con potasio (Santiago et al., 1993; Kametani et al., 1995).

Dado que la concentración extracelular de dopamina es el resultado final del balance entre los procesos de liberación y transporte y que los procesos de transporte se ven claramente reducidos en el envejecimiento (Joseph et al., 1990;

## Discusión

Shimizu y Prasad, 1991; Felten et al., 1992; Araki et al., 1997), es posible que la ausencia de cambios en el estriado pueda ser debida a una reducción en la capacidad de transporte mayor que en el núcleo accumbens, lo que aumentaría la difusión de la dopamina desde sus sitios de liberación, y mantendría elevada la concentración extracelular de dopamina por periodos más largos. Se ha sugerido que este tipo de cambios puedan estar jugando un papel importante en el mantenimiento de la concentración extracelular de dopamina tras lesiones extensas en el estriado (Robinson y Whishaw, 1988; Van Horne et al., 1992). Dada la importancia de la difusión de neurotransmisores, en especial a la dopamina, en el funcionamiento normal de circuitos específicos del cerebro (Barbour y Häusser, 1997; Descarries et al., 1997; Zoli et al., 1998), estos cambios podría tener importantes consecuencias en el mantenimiento de las funciones comportamentales que están mediadas por el estriado. De hecho se ha relacionado esta reducción en el transporte de dopamina, con el consecuente aumento en la difusión de la dopamina, en la recuperación funcional observada en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson (Schneider et al., 1994). Estos cambios en el transporte de dopamina podría explicar también el aumento de la concentración de dopamina en el estriado en ratas de edad media, de manera que una reducción en el transporte sin cambios en la liberación de dopamina conduciría a un aumento de la concentración de dopamina. De hecho, se ha descrito que el tiempo que la dopamina extracelular permanece elevada tras estimulación con potasio en el estriado es mayor en ratas de edad media que en ratas jóvenes (Friedemann y Gerhardt, 1992).

Una posibilidad complementaria es que los cambios diferenciales descritos en la interacción entre glutamato y dopamina, y glutamato y GABA, sean debidos a cambios diferenciales en las reducciones en la densidad de receptores que median los efectos del glutamato. Diferentes estudios han mostrado una reducción de receptores del tipo NMDA tanto en el estriado como en el núcleo accumbens (Wenk et al., 1991; Magnusson y Cotman, 1993; Serra et al., 1994; Castorina et al., 1994; Wardas et al., 1997) así como una reducción de las respuestas mediada por este receptor en estriado (Gonzales et al., 1991; Cepeda et al., 1996). En este sentido, se ha descrito una reducción de la liberación *in vitro* de dopamina inducida por NMDA en el estriado de ratas viejas (Gonzales et al., 1991). Dada la diferente participación de los receptores glutamatérgicos en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (ver discusión más arriba), la existencia de una reducción en los receptores de tipo NMDA, que estimulan la liberación de dopamina, frente a un mantenimiento de receptores metabotrópicos, que parecen reducir la liberación de dopamina, podría explicar los cambios diferenciales en los aumentos de la concentración de dopamina descritos en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, no existe información suficiente en la bibliografía como para concluir las causas de estos efectos diferenciales del envejecimiento sobre la interacción de neurotransmisores.

Los cambios en la interacción entre glutamato y dopamina y glutamato y GABA en el núcleo accumbens podría tener gran importancia en algunos de los déficits motores descritos durante el envejecimiento. La conectividad del núcleo accumbens sugiere que actuaría como "interfase" a través de la cual las estructuras límbicas influirían sobre los sistemas motores efectores, y que estas influencias límbicas sobre el comportamiento están controladas y moduladas por el sistema

## *Discusión*

dopaminérgico mesolímbico (Willner et al., 1991). Se ha sugerido, por tanto, que el núcleo accumbens de la rata puede jugar un papel crítico en la regulación de la actividad locomotora espontánea así como en el aumento de la actividad locomotora tras inyección de anfetamina (Huang et al., 1995). Esta hipótesis está en consonancia con el aumento de la actividad locomotora producido por la inyección de agonistas glutamatérgicos en el núcleo accumbens, y la dependencia de este efecto de la actividad dopaminérgica (Svensson et al., 1994; Queen et al., 1998). Por otro lado, diversos estudios han mostrado una reducción con la edad en la actividad locomotora espontánea e inducida por anfetamina (Emerich et al., 1993; Huang et al., 1995; Crawford y Levine, 1997; Hebert y Gerhardt, 1998). Es posible, por tanto, que las alteraciones en la interacción entre glutamato y dopamina, (y entre glutamato y GABA) en el núcleo accumbens puedan estar en la base de estos déficits motores.

Aunque serán necesarios futuros estudios para determinar el papel de la interacción entre neurotransmisores en el estriado y el núcleo accumbens en los déficits motores relacionados con la edad, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral nos muestran que los cambios en la interacción de neurotransmisores que se producen durante el envejecimiento son bastante específicos del circuito neuroquímico estudiado. Por tanto, estos estudios nos permitirán entender mejor las alteraciones en la conducta motora con la edad en las que estas áreas cerebrales parecen estar implicadas.

*CONCLUSIONES*



## **CONCLUSIONES**

1. El uso de un bloqueante selectivo del transportador de alta afinidad para el glutamato (PDC), combinado con la técnica de microdiálisis en el animal despierto, ha mostrado ser una buena aproximación para el estudio de la interacción *in vivo* entre el glutamato endógeno y otros sistemas de neurotransmisores en circuitos específicos del cerebro, y sus posibles cambios durante el envejecimiento.

2. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran la existencia de un gradiente dorsoventral en los efectos del envejecimiento sobre la interacción entre glutamato y dopamina, y glutamato y GABA en la rata despierta, con cambios en los animales de edad vieja en el núcleo accumbens y ausencia de cambios en el estriado.

3. En el núcleo accumbens los incrementos en la concentración de dopamina inducidos por el glutamato son menores en ratas viejas que en ratas jóvenes, mientras que los incrementos de la concentración de GABA tienden a aumentar significativamente con la edad. Es posible que estas alteraciones en la interacción entre glutamato y dopamina, y entre glutamato y GABA, en el núcleo accumbens puedan estar en la base de la reducción en la actividad locomotora con la edad descrita en la rata.

4. El ciclo de síntesis de glutamato a partir de glutamina se ve alterado con la edad tanto en el estriado como en el núcleo accumbens de la rata despierta en el sentido de que la síntesis de glutamato parece ser menor en ratas de edad vieja comparado con ratas jóvenes. Estos cambios pueden estar compensados, como ocurre en el núcleo accumbens, por un aumento de la concentración de glutamina.

## *BIBLIOGRAFÍA*

## Bibliografía

Abdulla, F.A., M.A.J. Abu-Bakra, M.-R. Calaminici, J.D. Stephenson y J.D. Sinden. Importance of forebrain cholinergic and GABAergic systems to the age-related deficits in water maze performance of rats. *Neurobiol.Aging* **16**:41-52 (1995)

Amara, S.G. y M.J. Kuhar. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu.Rev.Neurosci.* **16**:73-93 (1993)

Arai, I., T. Shimazoe, S. Shibata, H. Inoue, A. Yoshimatsu and S. Watanabe. Enhancement of dopamine release from striatum through metabotropic glutamate receptor activation in methamphetamine sensitized rats. *Brain Res. Dev.* **729**, 277-280 (1996)

Araki, T., H. Kato, K. Shuto, T. Fujiwara y Y. Itoyama. Effect of aging on dopaminergic receptors and uptake sites in the rat brain studied by receptor autoradiography. *J.Neurol.Sci.* **148**:131-137 (1997)

Arnsten, A.F.T. Catecholamine mechanisms in age-related cognitive decline. *Neurobiol.Aging* **14**:639-641 (1993)

Arzate, M.E., J. Morán y H. Pasantés-Morales. Inhibitory effect of taurine on 4-aminopyridine-stimulated release of labelled dopamine from striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* **25**:689-694 (1986)

Attwell, D., B. Barbour y M. Szatkowski. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* **11**:401-407 (1993)

Attwell, D. y P. Mobbs. Neurotransmitter transporters. *Curr.Opin.Neurobiol.* **4**:353-359 (1994)

Balcar, V.J., Y. Li y S. Killinger. Effects of L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate and L-threo-3-hydroxyaspartate on the binding of [3H]L-aspartate, [3H]alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), [3H]DL-(E)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-3-pentenoate (CGP 39653), [3H]6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and [3H]kainate studied by autoradiography in rat forebrain. *Neurochem.Int.* **26**:155-164 (1995)

Banay-Schwartz, M., A. Lajtha y M. Palkovits. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements I. Glutamate and related amino acids. *Neurochem.Res.* **14**:555-562 (1989a)

Banay-Schwartz, M., A. Lajtha y M. Palkovits. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements II. Taurine and small neutral amino acids. *Neurochem.Res.* **14** :563-570 (1989b)

## Bibliografía

- Barbeito, L., A. Chéramy, G. Godeheu, J.M. Desce y J. Glowinski. Glutamate receptors of a quisqualate-kainate subtype are involved in the presynaptic regulation of dopamine release in the cat caudate nucleus in vivo. *Eur.J.Neurosci.* **2**:304-311 (1990)
- Barbour, B. y M.A. Häusser. Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends Neurosci.* **20**:377-384 (1997)
- Barnes, C.A. Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends Neurosci.* **17**:13-18 (1994)
- Baskys, A. Metabotropic receptors and "slow" excitatory actions of glutamate agonists in the hippocampus. *Trends Neurosci.* **15**:92-96 (1992)
- Baskys, A., J.N. Reynolds y P.L. Carlen. NMDA depolarizations and long-term potentiation are reduced in the aged rat neocortex. *Brain Res.* **530**:142-146 (1990)
- Beetsch, J.W. y J.E. Olson. Taurine transport in rat astrocytes adapted to hyperosmotic conditions. *Brain Res.* **613**:10-15 (1993)
- Benveniste, H. Brain microdialysis. *J.Neurochem.* **52**:1667-1679 (1989)
- Bernath, S. y M.J. Zigmond. Characterization of [<sup>3</sup>H]GABA release from striatal slices: evidence for a calcium-independent process via the GABA uptake system. *Neuroscience* **27**:563-570 (1988)
- Bianchi, L., F. Galeffi, S. Bartolini, J.P. Bolam, y L. Della Corte. The evoked release of endogenous amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. A dual microdialysis study in the freely moving rat. En: *Monitoring molecules in neurosciences*. González-Mora, J.L., Borges, R. and Mas, M. (eds.). University of La Laguna, pp: 176-177 (1996)
- Bittiger, H., W. Froestl, S.J. Mickel y H.-R. Olpe. GABA-B receptor antagonists: from synthesis to therapeutic applications. *Trends Pharmacol.Sci.* **14**: 391-394 (1993)
- Björklund, A. y O. Lindvall. Dopamine containing systems in CNS. En: *Handbook of chemical neuroanatomy. Vol. 2: classical transmitters in the CNS*. Björklund, A. y Hokfelt, T. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 55-122 (1984)
- Blitzblau, R., S. Gupta, S. Djali, M.B. Robinson y P.A. Rosenberg. The glutamate transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity in rat cortical cultures. *Eur.J.Neurosci.* **8**:1840-1852 (1996)

## Bibliografía

- Bloc, A., D. Samuel, C. Forni, N. Dusticier y L. Kerkerian-Le Goff. Effects of ionotropic excitatory amino acid receptor antagonists on glutamate transport and transport-mediated changes in extracellular excitatory amino acids in the rat striatum. *J.Neurochem.* **64**:1598-1604 (1995)
- Bonanno, G. y M. Raiteri. Multiple GABA-B receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* **14**:259-261 (1993)
- Bormann, J. y A. Feigenspan. GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends Neurosci.* **18**:515-519 (1995)
- Bouyer, J.J., D.H. Park, T.H. Joh y V.M. Pickel. Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res.* **302**:267-275 (1984)
- Bowery, N.G. GABA-B receptor pharmacology. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **33**:109-147 (1993)
- Bowery, N.G., D.R. Hill, A.L. Hudson, A. Doble, D.N. Middlemiss, J. Shaw y M. Turnbull. (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* **283**:92-94 (1980)
- Bowyer, J.F., P. Clausing y G.D. Newport. Determination of d-amphetamine in biological samples using high-performance liquid chromatography after precolum derivatization with o-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid. *J.Chromatogr.* **666**:241-250 (1995)
- Bradford, H.F., H.K. Ward y A.J. Thomas. Glutamine-A major substrate for nerve endings. *J.Neurochem.* **30**:1453-1459 (1978)
- Bridges, R.J., M.S. Stanley, M.W. Anderson, C.W. Cotman y A.R. Camberlin. Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4- dicarboxylate diastereomer. *J.Med.Chem.* **34**:717-725 (1991)
- Brizzee, K.R., T. Samorajski, D.L. Brizzee, J.M. Ordy, W. Dunlap, y R. Smith. Age pigments and cell loss in the mammalian nervous system: functional implications. En: *Aging, Vol. 21: Brain aging: neuropathology and neuropharmacology.* Cervós-Navarro, J. y Sarkander, H.-I. (eds.). Raven Press, New York, pp: 211-229 (1983)
- Brody, H. The aging brain. *Acta Neurol.Scand.* **137**:40-44 (1992)
- Burt, R.D. y G.L. Kamatchi. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* **5**:2916-2923 (1991)

## Bibliografía

Carlsson, A. Brain neurotransmitters in normal and pathological aging. En: *The biological substrates of Alzheimer's disease*. Scheibel, A.B. , Wechsler, A.F. and Brazier, M.A.B. (eds.). Academic Press, Orlando, pp: 193-203 (1986)

Carlsson, M. y A. Carlsson. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia - implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **13**:272-276 (1990)

Carlsson, M., A. Svensson y A. Carlsson. Interactions between excitatory amino acids, catecholamines and acetylcholine in the basal ganglia. En: *Excitatory amino acids*. Simon, R.P. (ed.). Thieme, New York, pp: 189-194 (1992)

Castorina, M., A.M. Ambrosini, L. Pacifici, M.T. Ramacci y L. Angelucci. Age-dependent loss of NMDA receptors in hippocampus, striatum, and frontal cortex of the rat: prevention by acetyl-L-carnitine. *Neurochem.Res.* **19**:795-798 (1994)

Cepeda, C., Z. Li y M.S. Levine. Aging reduces neostriatal responsiveness to N-methyl-D-aspartate and dopamine: an *in vitro* electrophysiological study in vitro. *Neuroscience* **73**:733-750 (1996)

Chen, Q., C.L. Veenman y A. Reiner. Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *Neuroscience* **73**:715-731 (1996)

Cimino, M., P. Marini, S. Colombo, F. Cattabeni y J. Meldolesi. [<sup>3</sup>H]-CGP 39653 Mapping of glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptors in the brain of aged rats. *Neurosci.Res.Comm.* **12**:31-39 (1993)

Clements, J.D. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci.* **19**:163-171 (1996)

Cobo, M., I. Expósito, A. Porrás y F. Mora. Release of amino acid neurotransmitters in different cortical areas of conscious adult and aged rats. *Neurobiol.Aging* **13**:705-709 (1992)

Cohen, S.A. y W.E. Müller. Age-related alterations of NMDA-receptor properties in the mouse forebrain: partial restoration by chronic phosphatidylserine treatment. *Brain Res.* **584**:174-180 (1992)

Coleman, P.D. y D.G. Flood. Dendritic proliferation in the aging brain as a compensatory repair mechanism. En: *Aging of the brain and alzheimer's disease. Progress in brain research. Volume 70*. Swaab, D.F., Fliers, E., Mirmiran, M. , Van Gool, W.A. and Van Haaren, F. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 227-237 (1986)

## Bibliografía

Coleman, P.D. y D.G. Flood. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging* **8**:521-545 (1987)

Cooper, J.R., Bloom, F.E. y Roth, R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press, New York (1996)

Corsi, C., M. Pazzagli, L. Bianchi, L. Della Corte, G. Pepeu y F. Pedata. *In vivo* amino acid release from the striatum of aging rats: adenosine modulation. *Neurobiol.Aging* **18**: 243-250 (1997)

Cotman, C.W., D.T. Monaghan, O.P. Ottersen y J. Storm-Mathisen. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* **10**:273-280 (1987)

Côté, L. y M.D. Crutcher. The basal ganglia. En: *Principles of neural science*. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, T.M. (eds.). Appleton & Lange, Norwalk, pp: 647-659 (1991)

Crawford, C.A. y M.S. Levine. Dopaminergic function in the neostriatum and nucleus accumbens of young and aged Fisher 344 rats. *Neurobiol.Aging* **18**:57-66 (1997)

Dani, S.U. Histological markers of neuronal aging and their meaning. En: *Principles of neural aging*. Dani, S.U., Hori, A. and Walter, G.F. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 263-278 (1997)

David, J.F., F. Ghazali, C.F. Bianco, A. Watzet, S. Delaine, B. Boniface, C. Di Menza y A. Delacourte. Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain. *Neurosci.Lett.* **235**:53-56 (1997)

Davis, J.M. y W.A. Himwich. Neurochemistry of the developing and aging mammalian brain. *Neurobiol.Aging* **9**:329-357 (1975)

Dawson, R. y D.R. Wallace. Kainic acid-induced seizures in aged rats: Neurochemical correlates. *Brain Res.Bull.* **29**:459-468 (1992)

Dawson, R., Jr., D.R. Wallace y M.J. Meldrum. Endogenous Glutamate Release from Frontal Cortex of Adult and Aged Rats. *Neurobiol.Aging* **10**:665-668 (1989)

Del Arco, A. and F. Mora. High affinity glutamate transporter inhibitors blocked the release of glutamate but not dopamine, induced by amphetamine in striatum of the freely moving rat. *J.Physiol.Biochem.* **53**: 105-105 (1997)

## Bibliografía

Della Corte, L., J.P. Bolam, D.J. Clarke, D.M. Parry y A.D. Smith. Sites of [3H]taurine uptake in the rat substantia nigra in relation to the release of taurine from the striatonigral pathway. *Eur.J.Neurosci.* **2**:50-61 (1990)

DeLorey, T.M. y R.W. Olsen. GABA and glycine. En: *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. and Molinoff, P.B. (eds.). Raven Press, New York, pp: 389-399 (1994)

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

Desce, J.M., G. Godeheu, T. Galli, F. Artaud, A. Cherámy y J. Glowinski. Presynaptic facilitation of dopamine release through D,L-alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptors on synaptosomes from the rat striatum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **259**:692-698 (1991)

Dluzen, D.E., J.L. McDermott y V.D. Ramirez. Changes in dopamine release in vitro from the corpus striatum of young versus aged rats as a function of infusion modes of L-DOPA, potassium, and amphetamine. *Exp.Neurol.* **112**:153-160 (1991)

Dobrev, D., E. Bergsträber, H.-D. Fischer y K. Andreas. Restriction and functional changes of dopamine release in rat striatum from young adult and old rats. *Mech.Ageing Dev.* **80**:107-119 (1995)

Donzanti, B.A., J.F. Hite y B.K. Yamamoto. Extracellular glutamate levels increase with age in the lateral striatum: potential involvement of presynaptic D2 receptors. *Synapse* **13**:376-382 (1993)

Donzanti, B.A. y A.K. Ung. Alterations in neurotransmitter amino acid content in the aging rat striatum are subregion dependent. *Neurobiol.Aging* **11**:159-162 (1990)

Emerich, D.F., P. McDermott, P. Krueger, M. Banks, J. Zhao, J. Marszalkowski, B. Frydel, S.R. Winn y P.R. Sanberg. Locomotion of aged rats: relationship to neurochemical but not morphological changes in nigrostriatal dopaminergic neurons. *Brain Res.Bull.* **32**:477-486 (1993)

Expósito, I., A. Del Arco, G. Segovia y F. Mora. Endogenous dopamine increases extracellular concentrations of glutamate and GABA in striatum of the freely moving rat: involvement of D1 and D2 dopamine receptors. *Neurochem.Res.* (en prensa) (1999)

Expósito, I., F. Mora, N. Zisapel y S. Oaknin. The modulatory effect of melatonin on the dopamine-glutamate interaction in the anterior hypothalamus during aging. *NeuroReport* **6**:2399-2403 (1995)



## Bibliografía

Fagg, G.E. y A.C. Foster. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* **9**:701-719 (1983)

Farooqui, A.A. y L.A. Horrocks. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res.Rev.* **16**:171-191 (1991)

Felten, D.L., S.Y. Felten, R.W. Fuller, T.D. Romano, E.B. Smalstig, D.T. Wong y J.A. Clemens. Chronic dietary pergolide preserves nigrostriatal neuronal integrity in aged-fischer-344 rats. *Neurobiol.Aging* **13**:339-351 (1992)

Finch, C.E. y D.G. Morgan. RNA and protein metabolism in the aging brain. *Ann.Rev.Neurosci.* **13**:75-87 (1990)

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)

Fornieles, F., J.M. Peinado and F. Mora. Endogenous levels of amino acids neurotransmitters in different regions of frontal and temporal cortex of the rat during the normal process of aging. *NELED Suppl.* **26** (1986)

Freeman, G.B. y G.E. Gibson. Selective alteration of the mouse brain neurotransmitter release with age. *Neurobiol.Aging* **8**:147-152 (1987)

Freund, T.F., J.F. Powell y A.D. Smith. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* **13**:1189-1215 (1984)

Friedemann, M.N. y G.A. Gerhardt. Regional effects of aging on dopaminergic function in the Fisher-344 rat. *Neurobiol.Aging* **13**:325-332 (1992)

Fykse, E.M. y F. Fonnum. Uptake of gamma-aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *J.Neurochem.* **50**:1237-1242 (1988)

Gardner, E.L., J. Chen y W. Paredes. Overview of chemical sampling techniques. *J.Neurosci.Methods* **48**:173-197 (1993)

Garris, P.A., J.R.C. Christensen, G.V. Rebec y R.M. Wightman. Real-time measurement of electrically evoked extracellular dopamine in the striatum of freely moving rats. *J.Neurochem.* **68**:152-161 (1997)

## Bibliografía

- Gegelashvili, G. y A. Schousboe. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res.Bull.* **45**:233-238 (1998)
- Gilad, G.M., V.H. Gilad y Y. Tizabi. Aging and stress-induced changes in choline and glutamate uptake in hippocampus and septum of two rat strains differing in longevity and reactivity to stressors. *Int.J.Devl.Neuroscience* **8**:709-713 (1990)
- Giorgi, O., G. De Montis, M.L. Porceddu, S. Mele, G. Calderini, G. Toffano y G. Biggio. Developmental and age-related changes in D1-dopamine receptors and dopamine content in the rat striatum. *Dev.Brain Res.* **35**:283-290 (1987)
- Giorgi, O., M.G. Pibiri, R. Dal Toso y G. Ragatzu. Age-related changes in the turnover rates of D1-dopaminergic receptors in the retina and in distinct areas of the rat brain. *Brain Res.* **569**:323-329 (1992)
- Godefroy, F., M.H. Bassant, J. Weil-Fugazza y Y. Lamour. Age-related changes in dopaminergic and serotonergic indices in the rat forebrain. *Neurobiol.Aging* **10**:187-190 (1989)
- Gonzales, R.A., L.M. Brown, T.W. Jones, R.D. Trent, S.L. Westbrook y S.W. Leslie. N-methyl-D-aspartate mediated responses decrease with age in Fischer 344 rat brain. *Neurobiol.Aging* **12**:219-225 (1991)
- Greenamyre, J.T. Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia: relationship to Parkinson's disease. *J.Neural Transm.-Gen.Sect.* **91**: 255-269 (1993)
- Greenwood, C.E., W.G. Tatton, N.A. Seniuk y F.G. Biddle. Increased dopamine synthesis in aging substantia nigra neurons. *Neurobiol.Aging* **12**:557-565 (1991)
- Gregerson, K.A. y M. Selmanoff. Changes in the kinetics of [3H]dopamine release from median eminence and striatal synaptosomes during aging. *Endocrinology* **126**:228-234 (1990)
- Groenewegen, H.J., H.W. Berendse, G.E. Meredith, S.N. Haber, P. Voorn, J.G. Wolters, y A.S.M. Lohman. Functional anatomy of the ventral, limbic system-innervated striatum. En: *The mesolimbic dopamine system: from motivation to action*. Willner, P. y Scheel-Krüger, J. (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, pp: 19-59 (1991)
- Hanbauer, I., D. Wink, Y. Osawa, G.M. Edelman y J.A. Gally. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. *NeuroReport* **3**:409-412 (1992)

## Bibliografía

Haug, H. The aging human cerebral cortex: morphometric of areal differences and their functional meaning. En: *Principles of neural aging*. Dani, S.U., Hori, A. and Walter, G.A. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 247-261 (1997)

Häusser, M.A., W.H. Yung y M.G. Lacey. Taurine and glycine active the same Cl<sup>-</sup> conductance in substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res.* **571**:103-108 (1992)

Hebert, M.A. y G.A. Gerhardt. Normal and drug-induced locomotor behavior in aging: comparison to evoked DA release and tissue content in Fischer 344 rats. *Brain Res.* **797**:42-54 (1998)

Hollmann, M. y S. Heinemann. Cloned glutamate receptors. *Annu.Rev.Neurosci.* **17**:31-108 (1994)

Hu, G., P. Duffy, R.E. See y P.W. Kalivas. Stimulation of group II and III mGluRs inhibit dopamine release in nucleus accumbens of rat. *Soc.Neurosci.Abst.* **24**:585(1998)

Huang, R.-L., C.-T. Wang, M.-Y. Tai, Y.-F. Tsai y M.-T. Peng. Effects of age on dopamine release in the nucleus accumbens and amphetamine-induced locomotor activity in rats. *Neurosci.Lett.* **200**:61-64 (1995)

Huxtable, R.J. Taurine in the central nervous system and mammalian actions of taurine. *Prog.Neurobiol.* **32**:471-533 (1989)

Huxtable, R.J. y L.A. Sebring. Towards a unifying theory for the actions of taurine. *Trends Pharmacol.Sci.* **7**:481-485 (1986)

Hyttel, J. Parallel decrease in the density of dopamine D1 and D2 receptors in corpus striatum of rats from 3 to 25 months of age. *Pharmacol.Toxicol.* **64**:55-57 (1989)

Imperato, A., T. Honoré y L.H. Jensen. Dopamine release in the nucleus caudatus and in the nucleus accumbens is under glutamatergic control through non-NMDA receptors: a study in freely-moving rats. *Brain Res.* **530**:223-228 (1990)

Jolles, J. Cognitive, emotional and behavioral dysfunctions in aging and dementia. En: *Aging of the brain and Alzheimer's disease. Progress in brain research. Volume 70*. Swaab, D.F., Fliers, E., Mirmiran, M., Van Gool, W.A. and Van Haaren, F. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 15-39 (1986)

Joseph, J.A., T.K. Dalton y W.A. Hunt. Age-related decrements in the muscarinic enhancement of K<sup>+</sup>-evoked release of endogenous striatal dopamine: an indicator of altered cholinergic-dopaminergic reciprocal inhibitory control in senescence. *Brain Res.* **454**:140-148 (1988)

## Bibliografía

Joseph, J.A., G.S. Roth y R. Strong. The striatum, a microcosm for the examination of age-related alterations in the CNS: a selected review. *Review of Biological Research in Aging* 4:181-199 (1990)

Kametani, H., S. Iijima, E.L. Spangler, D.K. Ingram y J.A. Joseph. *In vivo* assessment of striatal dopamine release in the aged male Fischer 344 rat. *Neurobiol.Aging* 16:639-646 (1995)

Kamisaki, Y., K. Maeda, M. Ishimura, H. Omura y T. Itoh. Effects of taurine on depolarization-evoked release of amino acids from rat cortical synaptosomes. *Brain Res.* 627:181-185 (1993)

Kanai, Y., M. Stelzner, S. Nubberger, S. Khawaja, S.C. Hebert, C.P. Smith y M.A. Hediger. The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. *J.Biol.Chem.* 269:20599-20606 (1994)

Kanterewicz, B.I., R.E. Rosenstein, D.A. Golombek, P.C. Yannielli y D.P. Cardinali. Dially variations in GABA receptor function in Syrian hamster cerebral cortex. *Neurosci.Lett.* 200:211-213 (1995)

Katzman, R. y R. Terry. Normal aging of the nervous system. En: *Principles of geriatric neurology*. Katzman, R. y Rowe, J.W. (eds.). F.A.Davis, Philadelphia, pp: 18-58 (1992)

Keefe, K.A., M.J. Zigmond y E.D. Abercrombie. Extracellular dopamine in striatum: influence of nerve impulse activity in medial forebrain bundle and local glutamatergic input. *Neuroscience* 47:325-332 (1992)

Kendrick, K.M., R. Guevara-Guzman, C. De la Riva, J. Christensen, K. Ostergaard y P.C. Emson. NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmitters in the rat striatum: *in vivo* evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. *Eur.J.Neurosci.* 8:2619-2634 (1996)

Kita, H. GABAergic circuits of the striatum. En: *Progress in brain research*. Arbuthnott, G.W. y Emson, P.C. (eds.). Elsevier Science Research, Amsterdam , pp: 51-72 (1993)

Kiyatkin, E.A. y G.V. Rebec. Dopaminergic modulation of glutamate-induced excitations of neurons in the striatum and nucleus accumbens of awake unrestrained rats. *J.Neurophysiol.* 75:142-153S (1996)

Kondoh, T. y W.C. Low. Glutamate uptake blockade induces striatal dopamine release in 6-hydroxydopamine rats with intrastriatal grafts: evidence for host modulation of transplanted dopamine neurons. *Exp.Neurol.* 127:191-198 (1994)

## Bibliografía

Kosenko, E., Y. Kaminsky, E. Grau, M.D. Miñana, S. Grisolia y V. Felipo. Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. *Neurochem.Res.* **20**:451-456 (1995)

Kosenko, E., Y. Kaminsky, E. Grau, M.D. Miñana, G. Marcaida, S. Grisolia y V. Felipo. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *J.Neurochem.* **63**:2172-2178 (1994)

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

Krebs, M.-O., M.L. Kemel, C. Gauchy, M. Desban y J. Glowinski. Local GABAergic regulation of the N-methyl-D-aspartate-evoked release of dopamine is more prominent in striosomes than in matrix of the rat striatum. *Neuroscience* **57**:249-260 (1993)

Krebs, M.O., J.M. Desce, M.L. Kemel, C. Gauchy, G. Godeheu, A. Cheramy y J. Glowinski. Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J.Neurochem.* **56**:81-85 (1991)

Krespan, B., S. Berl y W.J. Nicklas. Alteration in neuronal-glia metabolism of glutamate by the neurotoxin kainic acid. *J.Neurochem.* **38**:509-518 (1982)

Kullmann, D.M., G. Erdemli y F. Asztely. LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron* **17**:461-474 (1996)

Kuriyama, K. Taurine as a neuromodulator. *Federation Proc.* **39**:2680-2684 (1980)

Lada, M.W., T.W. Vickroy y R.T. Kennedy. 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)

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

Lehmann, A., J.W. Lazarewicz y M. Zeise. N-methylaspartate-evoked liberation of taurine and phosphoethanolamine *in vivo*: site of release. *J.Neurochem.* **45**:1172-1177 (1985)

## Bibliografía

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

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

Lippa, A.S., D.J. Critchett, F. Ehlert, H.I. Yamamura, S.J. Enna y R.T. Bartus. Aged-related alterations in neurotransmitter receptors: An Electrophysiological and biomechanical analysis. *Neurobiol. Aging* **2**:3-8 (1981)

Lozano, A.M., A.E. Lang, W.D. Hutchison y J.O. Dostrovsky. New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and its treatment. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**:783-790 (1998)

Macdonald, R.L. y R.W. Olsen. GABA-A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**:569-602 (1994)

Magnusson, K.R. y C.W. Cotman. Effects of aging on NMDA and MK801 binding sites in mice. *Brain Res.* **604**:334-337 (1993)

Makman, M.H. Influence of normal aging on monoamines, monoamine receptors and associated signal transduction systems. En: *Neuroregulatory mechanisms in aging*. Makman, M.H. y Stefano, G.B. (eds.). Pergamon Press, Oxford, pp: 47-78 (1993)

Marotta, C.A., R.E. Majocho, J.F. Coughlin, H.J. Manz, P. Davies, M. Ventosa-Michelman, W-G. Chou, S.B. Zain, y E.M. Sajdel-Sulkowska. Transcriptional and translational regulatory mechanisms during normal aging of the mammalian brain and in Alzheimer's disease. En: *Aging of the brain and Alzheimer's disease. Progress in brain research. Volume 70*. Swaab, D.F., Fliers, E., Mirmiran, M., Van Gool, W.A. and Van Haaren, F. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 303-320 (1986)

Marshall, J.F. y A.J. Rosenstein. Age-related decline in rat striatal dopamine metabolism is regionally homogeneous. *Neurobiol. Aging* **11**:131-137 (1990)

Martin, D.L. y K. Rimvall. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* **60**:395-407 (1993)

Massieu, L., A. Morales-Villagrán y R. Tapia. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* **64**:2262-2272 (1995)

Massieu, L. y R. Tapia. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J. Neurochem.* **69**:1151-1160 (1997)

## Bibliografía

Márquez de Prado, B., L. Fernández, J. Sepúlveda, A. Galindo, T.R. Castañeda, A. Del Arco, G. Segovia and F. Mora. Variaciones circadianas de las concentraciones extracelulares de dopamina, glutamato y GABA en el estriado de la rata despierta. efectos de la perfusión intracerebral de melatonina. *Nutrición Clínica* **18**: 308 (1998)

McGeer, P.L. y E.G. McGeer. Neurotransmitters in the ageing brain. En: *The molecular basis of Neuropathology*. Davison, A.N. y Thompson, R.H.S. (eds.). Edward Arnold, London, pp: 631-648 (1981)

McGeer, P.L. y E.G. McGeer. Amino acid neurotransmitters. En: *Basic Neurochemistry*. Siegel, G.J., Agranoff, M.D., Albers, R.W. and Molinoff, P.B. (eds.). Raven Press, New York, pp: 311-332 (1989)

Meldrum, M.J., P. Glenton y R. Dawson, Jr. [3H]D-aspartic acid release in brain slices of adult and aged Fischer 344 rats. *Neurochem.Res.* **17**:151-156 (1992)

Menéndez, N., J.M. Solís, O. Herreras, A.S. Herranz y R.M. Del Rio. Role of endogenous taurine on the glutamate analogue-induced neurotoxicity in the rat hippocampus in vivo. *J.Neurochem.* **55**:714-717 (1990)

Miele, M., M.G. Boutelle y M. Fillenz. The source of physiologically stimulated glutamate efflux from the striatum of conscious rats. *J.Physiol.* **497**:745-751 (1996)

Miñana, M.D., E. Kosenko, G. Marcaida, C. Hermenegildo, C. Montoliu, S. Grisolia y V. Felipe. Modulation of glutamine synthesis in cultured astricytes by nitric oxide. *Cellular and Molecular Neurobiology* **17**:433-445 (1997)

Mitsushima, D., T. Mizuno y F. Kimura. Age-related changes in diurnal acetylcholine release in the prefrontal cortex of male rats as measured by microdialysis. *Neuroscience* **72**:429-434 (1996)

Miyoshi, R., S. Kito, N. Doudou y T. Nomoto. Age-related changes of strychnine-insensitive glycine receptors in rat brain as studied by *in vitro* autoradiography. *Synapse* **6**:338-343 (1990)

Moghaddam, B. y M.L. Bolinao. Glutamatergic antagonists attenuate ability of dopamine uptake blockers to increase extracellular levels of dopamine: implications for tonic influence of glutamate on dopamine release. *Synapse* **18**:337-342 (1994)

Moghaddam, B., R.J. Gruen, R.H. Roth, B.S. Bunney y R.N. Adams. Effect of L-glutamate on the release of striatal dopamine: in vivo dialysis and electrochemical studies. *Brain Res.* **518**:55-60 (1990)

## Bibliografía

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

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

Mugnaini, E. y W.H. Oertel. 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. y Hökfelt, T. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 436-608 (1985)

Murray, A.M. y J.L. Waddington. Age-related changes in the regulation of behaviour by D-1:D-2 dopamine receptor interactions. *Neurobiol.Aging* **12**:431-435 (1991)

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

Najlerahim, A., P.T. Francis y D.M. Bowen. Age-related alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. *Neurobiol.Aging* **11**:155-158 (1990)

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

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)

Nicholls, D.G. y D. Attwell. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol.Sci.* **11**:462-468 (1990)

Nichols, N.R., C.E. Finch y J.F. Nelson. Food restriction delays the age-related increase in GFAP mRNA in rat hypothalamus. *Neurobiol.Aging* **16**:105-110 (1995)

Norenberg, M.D. y A. Martínez-Hernández. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* **161**:303-310 (1979)

O'Boyle, K.M. y J.L. Waddington. Loss of rat striatal dopamine receptors with ageing is selective for D2 but not D1 sites: association with increased non-specific binding of the D1 ligand <sup>3</sup>H-piflutixol. *Eur.J.Pharmacol.* **105**:171-174 (1984)



## Bibliografía

- Obrenovitch, T.P., J. Urenjak y E. Zilkha. Evidence disputing the link between seizure activity and high extracellular glutamate. *J.Neurochem.* **66**:2446-2454 (1996)
- Ohno, M. y S. Watanabe. Persistent increase in dopamine release following activation of metabotropic glutamate receptors in the rat nucleus accumbens. *Neurosci.Lett.* **200**:113-116 (1995)
- Orrego, F. y S. Villanueva. The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience* **56**:539-555 (1993)
- Osborne, P.G., W.T. O'Connor y U. Ungerstedt. Effect of varying the ionic concentration of a microdialysis perfusate on basal striatal dopamine levels in awake rats. *J.Neurochem.* **56**:452-456 (1991)
- Palkovits, M., I. Elekes, T. Lang y A. Patthy. Taurine levels in discrete brain nuclei of rats. *J.Neurochem.* **47**:1333-1335 (1986)
- Palmer, A.M., P.J. Robichaud y C.T. Reiter. The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol.Aging* **15**:103-111 (1994)
- Paulsen, R.E., A. Contestabile, L. Villani y F. Fonnum. An *in vivo* model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J.Neurochem.* **48**:1377-1385 (1987)
- Paulsen, R.E. y F. Fonnum. Role of glial cells for the basal and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-evoked release of transmitter amino acids investigated by microdialysis. *J.Neurochem.* **52**:1823-1829 (1989)
- Paulson, P.E. y T.E. Robinson. 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)
- Pepeu, G. Acetylcholine and brain aging. *Pharmacol.Res.Comm.* **20**:91-97 (1988)
- Peterson, C. y C.W. Cotman. Strain-dependent decrease in glutamate binding to the N-methyl-D-aspartic acid receptor during aging. *Neurosci.Lett.* **104**:309-313 (1989)
- Petralia, R.S. y R.J. Wenthold. Types of excitatory amino acid receptors and their localization in the nervous system and hypothalamus. En: *Excitatory amino acids: Their role in neuroendocrine function.* Brann, D.W. y Mahesh, V.B. (eds.). CRC, Press, pp: 55-101 (1996)

## Bibliografía

- Petrinec, J., T. Guadalupe, B. Fumero, E. Viejo, J.L. González-Mora, y M. Mas. Effects of different anaesthetics on striatal dopaminergic activity as assessed by *in vivo* voltammetry. En: *Monitoring molecules in neuroscience*. González-Mora, J.L., Borges, R. and Mas, M. (eds.). Universidad de La Laguna, La Laguna, pp: 293-294 (1996)
- Piggott, M.A., E.K. Perry, R.H. Perry y J.A. Court. [3H]MK-801 binding to the NMDA receptor complex, and its modulation in human frontal cortex during development and aging. *Brain Res.* **588**:277-286 (1992)
- Pin, J.-P. y R. Duvoisin. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **34**:1-26 (1995)
- Ponzio, F., G. Calderini, G. Lomuscio, G. Vantini, G. Toffano y S. Algeri. Changes in monoamines and their metabolite levels in some brain regions of aged rats. *Neurobiol.Aging* **3**:23-29 (1982)
- Porrás, A. y F. Mora. Dopamine-glutamate-GABA interactions and ageing: studies in the striatum of the conscious rat. *Eur.J.Neurosci.* **7**:2183-2188 (1995)
- Porrás, A., G. Segovia, A. Del Arco y F. Mora. Glutamate and aging of the brain. *Mech.Ageing Dev.* (en prensa) (1999)
- Price, M.T., J.W. Olney y R. Haft. Age-related changes in glutamate concentrations and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. *Life Sci.* **28**:1365-1370 (1981)
- Queen, A., D. Meeker, J.-H. Kim and P. Vezina. Dopamine is necessary for nucleus accumbens (1S,3R)-ACPD-induced locomotion. *Soc.Neurosci.Abst.* **24**:585 (1998)
- Rao, G., C.A. Barnes y B.L. McNaughton. Effects of age on L-glutamate-induced depolarization in three hippocampal subfields. *Neurobiol.Aging* **14**:27-33 (1993)
- Rawls, S.M. y J.F. McGinty. L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid-evoked striatal glutamate levels are attenuated by calcium reduction, tetrodotoxin, and glutamate receptor blockade. *J.Neurochem.* **68**:1553-1563 (1997)
- Reid, M.S., W.T. O'Connor, M. Herrera-Marschitz y U. Ungerstedt. The effects of intranigral GABA and dynorphin A injections on striatal dopamine and GABA release: evidence that dopamine provides inhibitory regulation of striatal GABA neurons via D2 receptors. *Brain Res.* **519**:255-260 (1990)
- Rinne, J.O., P. Lönnberg y P. Marjamäki. Age-dependent decline in human brain dopamine D1 and D2 receptors. *Brain Res.* **508**:349-352 (1990)

## Bibliografía

Robinson, T.E. y I.Q. Whishaw. Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res.* **450**:209-224 (1988)

Rodríguez-Moreno, A., O. Herreras y J. Lerma. Kainate receptors persynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* **19**:893-901 (1997)

Rose, G.M., G.A. Gerhardt, G.L. Conboy y B.J. Hoffer. Age-related alterations in monoamine release from rat striatum: an in vivo electrochemical study. *Neurobiol. Aging* **7**:77-82 (1986)

Roth, R.H. CNS dopamine autoreceptors: distribution, pharmacology, and function. *Ann. NY Acad. Sci.* **430**:27-53 (1984)

Rothstein, J.D., M. Dykes-hoberg, C.A. Pardo, L.A. Bristol, L. Jin, R.W. Kuncl, Y. Kanai, M.A. Hediger, Y. Wang, J.P. Schielke y D.F. Welty. 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 B.L. Jacobs. Changes in forebrain serotonin at the light-dark transition: correlation with behaviour. *NeuroReport* **7**:1107-1111 (1996)

Ruzicka, B.B. y K.H. Jhamandas. Excitatory amino acid action on the release of brain neurotransmitters and neuromodulators: biochemical studies. *Prog. Neurobiol.* **40**:223-247 (1993)

Sabel, B.A. y D.G. Stein. Extensive loss of subcortical neurons in the aging rat brain. *Exp. Neurol.* **73**:507-516 (1981)

Sacaan, A.I., F.P. Bymaster y D.D. Schoepp. Metabotropic glutamate receptor activation produces extrapyramidal motor system activation that is mediated by striatal dopamine. *J. Neurochem.* **59**:245-251 (1992)

Samochocki, M. y J. Strosznajder. Age-related changes of GABA-activated chloride channel properties in brain cortex synaptic plasma membrane: evidence for phospholipase involvement. *J. Neurochem.* **63**:1522-1528 (1994)

Sands, S.B. y M.E. Barish. A quantitative description of excitatory amino acid neurotransmitter responses on cultured embryonic *Xenopus* spinal neurons. *Brain Res.* **502**:375-386 (1989)

## Bibliografía

Santiago, M., A. Machado y J. Cano. Effects of age and dopamine agonists and antagonists on striatal dopamine release in the rat: an in vivo microdialysis study. *Mech.Ageing Dev.* **67**:261-267 (1993)

Santiago, M., A. Machado y J. Cano. Regulation of the prefrontal cortical dopamine release by GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor agonists and antagonists. *Brain Res.* **630**:28-31 (1993)

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

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

Sánchez-Prieto, J., D.C. Budd, I. Herrero, E. Vázquez y D.G. Nicholls. Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. *Trends Neurosci.* **19**:235-239 (1996)

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

Scanziani, M., P.A. Salin, K.E. Vogt, R.C. Malenka y R.A. Nicoll. Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* **385**:630-634 (1997)

Schneider, J.S., D.S. Rothblat y L. DiStefano. Volume transmission of dopamine over large distances may contribute to recovery from experimental parkinsonism. *Brain Res.* **643**:89-61 (1994)

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

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

Segovia, G. y F. Mora. Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res.Bull.* **45**:275-279 (1998)

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

## Bibliografía

Segovia, G., A. Porrás y F. Mora. Effects of 4-aminopyridine on extracellular concentrations of glutamate in striatum of the freely moving rat. *Neurochem.Res.* **22**:1491-1497 (1997)

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

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

Sesack, S.R. y V.M. Pickel. In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other. *Brain Res.* **527**:266-279 (1990)

Sesack, S.R. y V.M. Pickel. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J.Comp.Neurol.* **320**:145-160 (1992)

Shibanoki, S., M. Kogure, M. Sugahara y K. Ishikawa. Effect of systemic administration of N-methyl-D-aspartic acid on extracellular taurine level measured by microdialysis in the hippocampal CA1 field and striatum of rats. *J.Neurochem.* **61**:1698-1704 (1993)

Shimizu, I. y C. Prasad. Relationship between [3H]mazindol binding to dopamine uptake sites and [3H]dopamine uptake in rat striatum during aging. *J.Neurochem.* **56**:575-579 (1991)

Shimizu, N., S. Duan, T. Hori y Y. Oomura. Glutamate modulates dopamine release in the striatum as measured by brain microdialysis. *Brain Res.Bull.* **25**:99-102 (1990)

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

Sieghart, W. GABA-A receptors: ligand-gated Cl<sup>-</sup> ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol.Sci.* **13**:446-450 (1992)

Smith, A.D. y J.P. Bolam. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci.* **13**:259-265 (1990)

Smolders, I., L. Bogaert, G. Ebinger y Y. Michotte. Muscarinic modulation of striatal dopamine, glutamate, and GABA release, as measured with in vivo microdialysis. *J.Neurochem.* **68**:1942-1948 (1997)

## Bibliografía

- Smolders, I., N. De Klippel, S. Sarre, G. Ebinger y Y. Michotte. Tonic GABA-ergic modulation of striatal dopamine release studied by *in vivo* microdialysis in the freely moving rat. *Eur.J.Pharmacol.* **284**:83-91 (1995)
- Smolders, I., S. Sarre, C. Vanhaesendonck, G. Ebinger y Y. Michotte. Extracellular striatal dopamine and glutamate after decortication and kainate receptor stimulation, as measured by microdialysis. *J.Neurochem.* **66**:2373-2380 (1996)
- Sohal, A.D.y L.S. Wolfe. Lipofuscin: characteristics and significance. En: *Aging of the brain ans Alzheimer's disease. Progress in brain research. Volume 70.* Swaab, D.F., Fliers, E., Mirmiran, M., Van Gool, W.A. and Van Haaren, F. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 171-183 (1986)
- Sprengel, R. y P.H. Seeburg. The unique properties of glutamate receptor channels. *FEBS Lett.* **325**:90-94 (1993)
- Steinhäuser, C. y V. Gallo. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* **19**:339-345 (1996)
- Stoessl, A.J., M.T. Martin-Iverson, T.M. Barth, C.T. Dourish y S.D. Iversen. Effects of ageing on the behavioural responses to dopamine agonists: decreased yawning and locomotion, but increased stereotypy. *Brain Res.* **495**:20-30 (1989)
- Strolin Benedetti, M., M. Cini, P. Fusi y P. Dostert. The effects of aging on MAO activity and acids levels in rat brain. *J.Neural Transm.* **29 (supl)**:259-268 (1990)
- Strolin Benedetti, M., P.A. Russo, P. Marrari y P. Dostert. Effects of ageing on the content in sulfur-containing amino acids in rat brain. *J.Neural Transm.* **86**:191-203 (1991)
- Strong, R., T. Samorajski y Z. Gottesfeld. High-affinity uptake of neurotransmitters in rat neostriatum: effects of aging. *J.Neurochem.* **43**:1766-1768 (1984)
- Strong, R., T. Samorajski y Z. Gottesfeld. Regional mapping of neostriatal neurotransmitter systems as a function of aging. *J.Neurochem.* **39**:831-836 (1984)
- Sved, A.F. y T. Curtis. Amino acid neurotransmitters in nucleus tractus solitarius: an *in vivo* microdialysis. *J.Neurochem.* **61**:2089-2098 (1993)
- Svensson, L., J. Zhang, K. Johannessen y J.A. Engel. Effect of local infusion of glutamate analogues into the nucleus accumbens of rats: an electrochemical and behavioural study. *Brain Res.* **643**:155-161 (1994)

## Bibliografía

Taber, M.T. y H.C. Fibiger. Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic glutamate receptors. *J.Neurosci.* **15**:3896-3904 (1995)

Tamaru, M., Y. Yoneda, K. Ogita, J. Shimizu y Y. Nagata. Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* **542**:83-90 (1991)

Tarazi, F.I., A. Campbell, S.K. Yeghiayan y R.J. Baldessarini. Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synapse* **30**:227-235 (1998)

Teichberg, V.I. Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *FASEB J.* **5**:3086-3091 (1991)

Terry, R.D. Interrelations among the lesions of normal and abnormal aging of the brain. En: *Aging of the brain and Alzheimer's disease. Progress in brain research. Volume 70*. Swaab, D.F., Fliers, E., Mirmiran, M., Van Gool, W.A. and Van Haaren, F. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 41-48 (1986)

Thanki, C.M., D. Sugden, A.J. Thomas y H.F. Bradford. *In vivo* release from cerebral cortex of [<sup>14</sup>C]glutamate synthesized from [U-<sup>14</sup>C]glutamate. *J.Neurochem.* **41**:611-617 (1983)

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

Thomsen, C., L. Hansen y P.D. Suzdak. L-glutamate uptake inhibitors may stimulate phosphoinositide hydrolysis in baby hamster kidney cells expressing mGluR1a via heteroexchange with L-glutamate without direct activation of mGluR1a. *J.Neurochem.* **63**:2038-2047 (1994)

Timmerman, W. y B.H.C. Westerink. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* **27**:242-261 (1997)

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

Van Horne, C., B.J. Hoffer, I. Strömberg y G.A. Gerhardt. Clearance and diffusion of locally applied dopamine in normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rat striatum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **263**:1285-1292 (1992)

## Bibliografía

Verma, A. and B. Moghaddam. Regulation of striatal dopamine release by metabotropic glutamate receptors. *Synapse* **28**:220-226(1998)

Volterra, A., P. Bezzi, B.L. Rizzini, D. Trotti, K. Ullensvang, N.C. Danbolt y G. Racagni. The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur.J.Neurosci.* **8**:2019-2028 (1996)

Wade, J.V., J.P. Olson, F.E. Samson y S.R. Nelson. A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. *J.Neurochem.* **5140**:740-745 (1988)

Waldmeier, P.C., P. Wicki and J.J. Feldtrauer. Release of endogenous glutamate from rat cortical slices in presence of the glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **384**:478-485 (1993)

Wallace, D.R. y R. Dawson, Jr. Effect of age and monosodium-L-glutamate (MSG) treatment on neurotransmitter content in brain regions from male Fischer-344 rats. *Neurochem.Res.* **15**:889-898 (1990)

Wang, G.-J., N.D. Volkow, J.S. Fowler, M. Fischman, R. Foltin, N.N. Abumrad, J. Logan y N.R. Pappas. Cocaine abusers do not show loss of dopamine transporters with age. *Life Sci.* **61**:1059-1065 (1997)

Ward, H.K., C.M. Thanki y H.F. Bradford. Glutamine and glucose as precursor of transmitter amino acids: ex vivo studies. *J.Neurochem.* **40**:855-860 (1983)

- Wardas, J., M. Pietraszek, G. Schulze, K. Ossowska y S. Wolfarth. Age-related changes in glutamate receptors: an autoradiographic analysis. *Pol.J.Pharmacol.* **49**:401-410 (1997)

Watanabe, H. Differential decrease in the rate of dopamine synthesis in several dopaminergic neurons of aged rat brain. *Exp.Gerontol.* **22**: 17-25 (1987)

Weiner, N. y Molinoff, P.B. Catecholamines. En: *Basic neurochemistry*. Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. and Molinoff, P.B. (eds.). Raven Press, New York, pp: 261-281 (1994)

Wenk, G.L., L.C. Walker, D.L. Price, L.C., y L.C. Corks. Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the Brains of Aged Rats and Monkeys. *Neurobiol.Aging* **12**:93-98 (1991)



## Bibliografía

- Westergaard, N., U. Sonnewald y A. Schousboe. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev.Neurosci.* **17**:203-211 (1995)
- Westerink, B.H.C. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav.Brain Res.* **70**:103-124 (1995)
- Westerink, B.H.C. y J.B. Justice. Microdialysis compared with other *in vivo* release models. En: *Microdialysis in the neurosciences*. Robinson, T.E. y Justice, J.B. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 23-43 (1991)
- Westerink, B.H.C., M. Santiago y J.B. De Vries. The release of dopamine from nerve terminals and dendrites of nigrostriatal neurons induced by excitatory amino acids in the conscious rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **345**:523-529 (1992)
- Wheeler, D. y J.G. Ondo. Time course of the aging of the high affinity L-glutamate transporter in rat cortical synaptosomes. *Exp.Gerontol.* **21**:159-168 (1986)
- Whitton, P.S., S. Maione, C.S. Biggs y L.J. Fowler. N-methyl-D-aspartate receptors modulate extracellular dopamine concentration and metabolism in rat hippocampus and striatum *in vivo*. *Brain Res.* **635**:312-316 (1994)
- Willner, P., S. Ahlenius, R. Muscat, y J. Scheel-Krüger. The mesolimbic dopamine system. En: *The mesolimbic dopamine system: from motivation to action*. Willner, P. y Scheel-Krüger, J. (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, pp: 3-15 (1991)
- Woodward, J.J., S.W. Leslie, J.A. Severson y R.E. Wilcox. Aging does not alter the voltage-dependent release of endogenous dopamine from mouse striatal synaptosomes. *Neurosci.Lett.* **97**:191-197 (1989)
- You, Z.-B., M. Herrera-Marschitz, I. Nylander, M. Goiny, W.T. O'connor, U. Ungerstedt y L. Terenius. The striatonigral dynorphin pathway of the rat studied with *in vivo* microdialysis-II. Effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists. *Neuroscience* **63**:427-434 (1994)
- Young, A.M.J. y H.F. Bradford. N-methyl-D-aspartate releases gamma-aminobutyric acid from rat striatum *in vivo*: a microdialysis study using a novel preloading method. *J.Neurochem.* **60**:487-492 (1993)
- Young, A.M.J., J.M. Crowder y H.F. Bradford. Potentiation by kainate of excitatory amino acid release in striatum: complementary *in vivo* and *in vitro* experiments. *J.Neurochem.* **50**:337-345 (1988)

## Bibliografía

Young, A.M.J., P.M. Foley y H.F. Bradford. Preloading in vivo: A rapid and reliable method for measuring gamma-aminobutyric acid and glutamate fluxes by microdialysis. *J.Neurochem.* **55**:1060-1063 (1990)

Youngren, K.D., D.A. Daly y B. Moghaddam. Distinct actions of endogenous excitatory amino acids on the outflow of dopamine in the nucleus accumbens. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **264**:289-293 (1993)

Zilkha, E., T.P. Obrenovitch, A. Koshy, H. Kusakabe y H.P. Bennetto. Extracellular glutamate: on-line monitoring using microdialysis coupled to enzyme-amperometric analysis. *J.Neurosci.Methods* **60**:1-9 (1995)

Zoli, M., C. Torri, R. Ferrari, A. Jansson, I. Zini, K. Fuxe y L.F. Agnati. The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res.Rev.* **26**:136-147 (1998)

