

R. 10067

T-532

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 211 número 7 del libro  
correspondiente.

de la  
de esta Universidad desde el día  
hasta el día

Sevilla, 15 ABR. 1987

Sevilla de de 19

El Jefe del Negociado de Tesis,

EL DIRECTOR DE

H. Yolanda Cruz Roldán

ESTUDIO DE LA CONCENTRACION DE LAS AMINAS BIOGENAS EN DISTINTAS  
ESTRUCTURAS CEREBRALES DURANTE EL DESARROLLO, EL ENVEJECIMIENTO  
Y LA DEPRIVACION VISUAL.

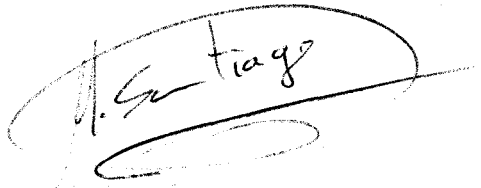


Tesis que presenta el Ldo.  
**Martiniano Santiago Pavón** pa-  
ra optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas.

Sevilla, Abril de 1987.

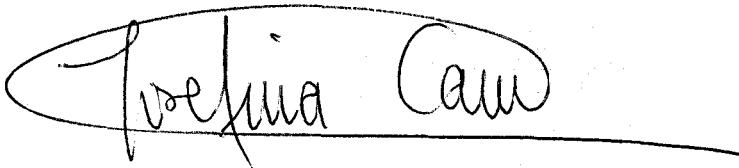
UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Tesis que presenta el Ldo. Martiniano Santiago Pavón  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'M. Santiago', enclosed within a large, hand-drawn oval.

Fdo. M. Santiago.

Vº Bº de la directora de Tesis:

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Josefina Cano', enclosed within a large, hand-drawn oval.

Fdo. Dra. Josefina Cano García.  
Profesora Titular.

Realizada con un Beca  
de Iniciación a la  
Investigación en España  
del Fondo Investigacio-  
nes Sanitarias.

Me gustaría expresar mi profundo y sincero agradecimiento a la Dra. Josefina Cano y al Dr. Alberto Machado por todo el enorme interés puesto en mi formación investigadora y, sobre todo, por la gran paciencia que han mostrado tener conmigo en estos tres años de continuo trabajo en el laboratorio.

A mis inseparables e incondicionales amigos Antonio y Pilar por su inestimable ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio.

A Antonio José, mi compañero de línea de investigación, por los buenos consejos, las grandes ideas y el buen humor que está dispuesto a dar a cualquier hora.

A Berta, Consuelo, Cristina, Elisa, Enrique, Isabel, Juan, María, Lourdes, M<sup>a</sup> Dolores, Marisa y José Luis por toda la ayuda laboral y moral que me han prestado en todo momento.

Al Dr. Manuel Losada por su amabilidad al aceptar la ponencia de esta tesis.

A mis padres y hermanas Trini y María José.

## INDICE.

Página.

### 1. INTRODUCCION

1.1. Aminas biógenas en el cerebro	1
1.1.1. Localización, síntesis y degradación de serotonina	1
1.1.2. Localización, síntesis y degradación de catecolaminas	6
1.2. Vía visual	13
1.2.1. Serotonina	13
1.2.2. Catecolaminas	16
1.2.3. Bienucleación	18
1.3. Núcleo caudo-putamen	20
1.4. Hipocampo	22
1.5. Objetivos	24

### 2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Animales de experimentación	26
2.2. Productos y reactivos	26
2.3. Material	30
2.4. Preparación de los patrones	33
2.5. Análisis de las muestras	33
2.5.1. Determinación de aminas biógenas en el cerebro	33
2.5.2 Determinación de triptófano en sangre	35
2.6. Estudio morfológico del geniculado lateral	36
2.6.1. Perfusión y fijación	36
2.6.2. Localización e inclusión del geniculado lateral dorsal	36

Página.

2.6.3. Microscopía electrónica	37
2.7. Puesta a punto de la técnica de medida por HPLC	37
2.7.1. Condiciones eléctricas	37
2.7.2. Elección de las columnas	37
2.7.3. Elección de la fase móvil	38
2.7.4. Método de homogeneización del tejido cerebral	39
2.7.5. Elección del flujo	39
2.7.6. Comprobación de la identidad de los picos	40

### 3. RESULTADOS

3.1. Determinación de triptófano en sangre	41
3.2. Vía visual	42
3.2.1. Desarrollo	42
3.2.1.1. Genuculado lateral	42
3.2.1.2. Corteza visual	47
3.2.1.3. Colículo superior	50
3.2.1.4. Tálamo posterior	56
3.2.2. Bienucleación	61
3.2.2.1. Genuculado lateral	61
3.2.2.2. Corteza visual	69
3.2.2.3. Colículo superior	76
3.2.2.4. Tálamo posterior	85
3.2.3. Envejecimiento	94
3.2.3.1. Genuculado lateral	94
3.2.3.2. Corteza visual	97
3.2.3.3. Colículo superior	100
3.2.3.4. Tálamo posterior	107

3.2.4. Estudio morfológico del geniculado lateral	112
3.3. Núcleo caudo-putamen	115
3.3.1. Desarrollo	115
3.3.2. Envejecimiento	120
3.4. Hipocampo	125
3.4.1. Desarrollo	125
3.4.2. Envejecimiento	130
<b>4. DISCUSION</b>	
4.1. Vía visual	135
4.1.1. Serotonina	135
4.1.2. Catecolaminas	142
4.1.3. Bienucleación	147
4.2. Núcleo caudo-putamen	151
4.3. Hipocampo	158
<b>5. CONCLUSIONES</b>	161
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	164



## 1. INTRODUCCION. -

### 1.1. Aminas biógenas en el cerebro. -

En la complicadísima red neuronal del sistema nervioso central (SNC) se seleccionan las señales recibidas por el sistema nervioso aferente y se elaboran en un modelo coordinado de mando para la emisión de señales a los órganos que las ejecutan, a través del sistema nervioso eferente. El cerebro sirve, además, para el almacenamiento de señales (memoria). El papel de determinadas células nerviosas en estos procesos depende de su situación (conexión) en la red general, pero de momento sólo pueden hacerse conjeturas. Para explicar dicho papel se puede estudiar la actividad de la señal química (neurotransmisor) de las células nerviosas en diferentes funciones del SNC.

Las células nerviosas, en el SNC se agrupan formando diferentes poblaciones caracterizadas bioquímicamente por el neurotransmisor correspondiente. Hasta ahora sólo algunas de estas poblaciones están caracterizadas de este modo. La identificación de neurotransmisores en el SNC es, por tanto, una de las principales contribuciones de la bioquímica a la aclaración de la función de los procesos bioquímicos en que se basan las funciones del SNC.

A continuación se describen las rutas metabólicas de los neurotransmisores serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA).

#### 1.1.1. Localización, síntesis y degradación de serotonina. -

Los cuerpos de las células serotoninérgicas parece ser que se localizan exclusivamente en el tronco cerebral, en grupos existentes en el bulbo (B<sub>1</sub> a B<sub>4</sub> y área postrema),

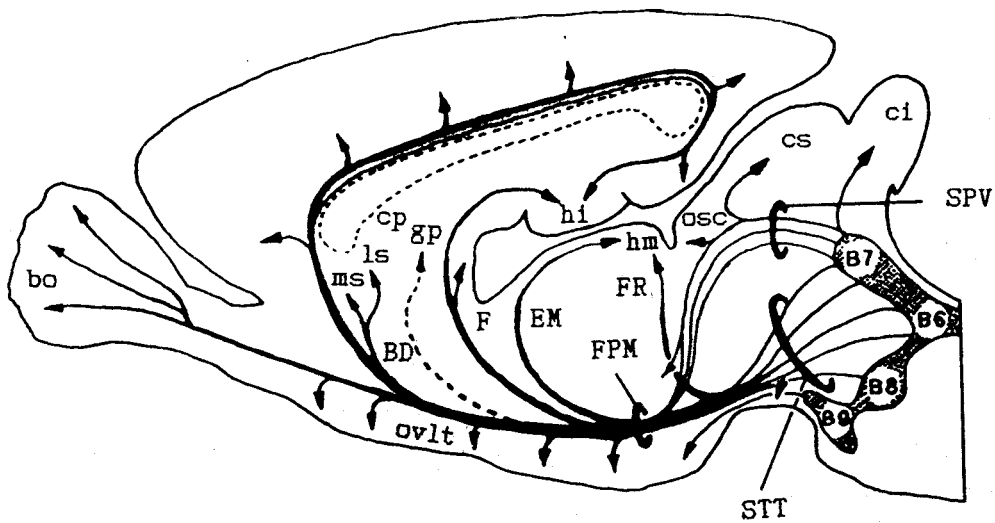


Figura 1. Representación esquemática de las vías ascendentes serotoninérgicas del cerebro de rata adulta. SPV: sistema periventricular; STT: sistema transtegmental; FPM: Fascículo del prosencéfalo medio; ci: colículo inferior; cs: colículo superior; ovlt: organum vasculosum laminae terminalis; osc: organum subcomisural; FR: fasciculus retroflexus; EM: estria medullaris; F: fornix; BD: banda diagonal de Broca; hm: habenula media; hi: hipocampo; gp: globus pallidus; cp: caudo-putamen; ms: núcleo medial septal; ls: núcleo lateral septal; bo: bulbo olfactorio.

protuberancia (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>) y mesencéfalo (B<sub>7</sub> a B<sub>9</sub>). La mayor parte de estos núcleos constituyen los núcleos del rafe del tronco cerebral, aunque, algunos se localizan fuera de la región del rafe, en el mesencéfalo (B<sub>7</sub>) y en la formación reticular ventromedial de la protuberancia (B<sub>3</sub>) (Dahlström y Fuxe, 1964) (fig. 1), desde donde se inervan las más variadas regiones cerebrales.

Resulta difícil localizar las proyecciones que parten de las neuronas serotoninérgicas. Se han distinguido proyecciones ascendentes que parten de los núcleos serotoninérgicos más rostrales, y descendentes que provienen de los núcleos bulbares. Se ha indicado que las células del rafe, además de proyectarse en dirección rostral y caudal, dan origen a una densa inervación en la zona más inferior del tronco cerebral (Ungerstedt, 1971).

La 5-HT se sintetiza en las neuronas serotoninérgicas, principalmente en las terminales nerviosas, a partir de triptófano procedente de la sangre en dos etapas: hidroxilación mediante triptófano hidroxilasa a 5-hidroxitriptófano y descarboxilación mediante L-aminoácido aromático-descarboxilasa a 5-HT (figs. 2 y 3).

La degradación de 5-HT se realiza mediante la monoamino oxidasa (MAO), que produce 5-hidroxiindolacetaldehído (5-HIA), y aldehído deshidrogenasa, con formación de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que llega a la sangre a través del líquido cerebroespinal y se conjuga en el hígado. La conjugación también tiene lugar parcialmente en el cerebro (fig. 2). La 5-HT puede ser degradada por una vía secundaria por medio de la enzima aldehído reductasa para producir 5-hidroxitriptofol, que se encuentra en el cerebro en muy bajas concentraciones, a partir de 5-hidroxiindolacetaldehído.

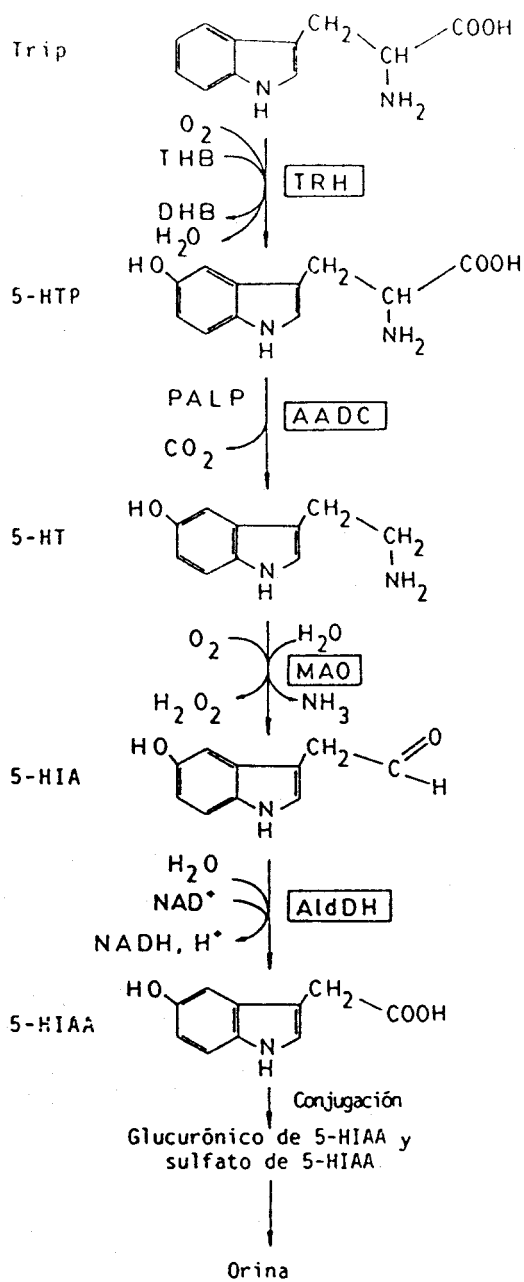


Figura 2. Síntesis y degradación de serotonina (5-HT).

Trip: triptófano; TRH: triptófano hidroxilasa;  
T(D)HB: tetra(d)hidrobiopterina; 5-HTP: 5-hidroxitriptófano;  
AADC: L-aminoácido aromático-descarboxilasa (DOPA-descarboxilasa); PALP: piridoxalfosfato; MAO: monoamino oxidasa;  
5-HIA: 5-hidroxiindolacetaldehído; AldDH: aldehído deshidrogenasa;  
5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético.

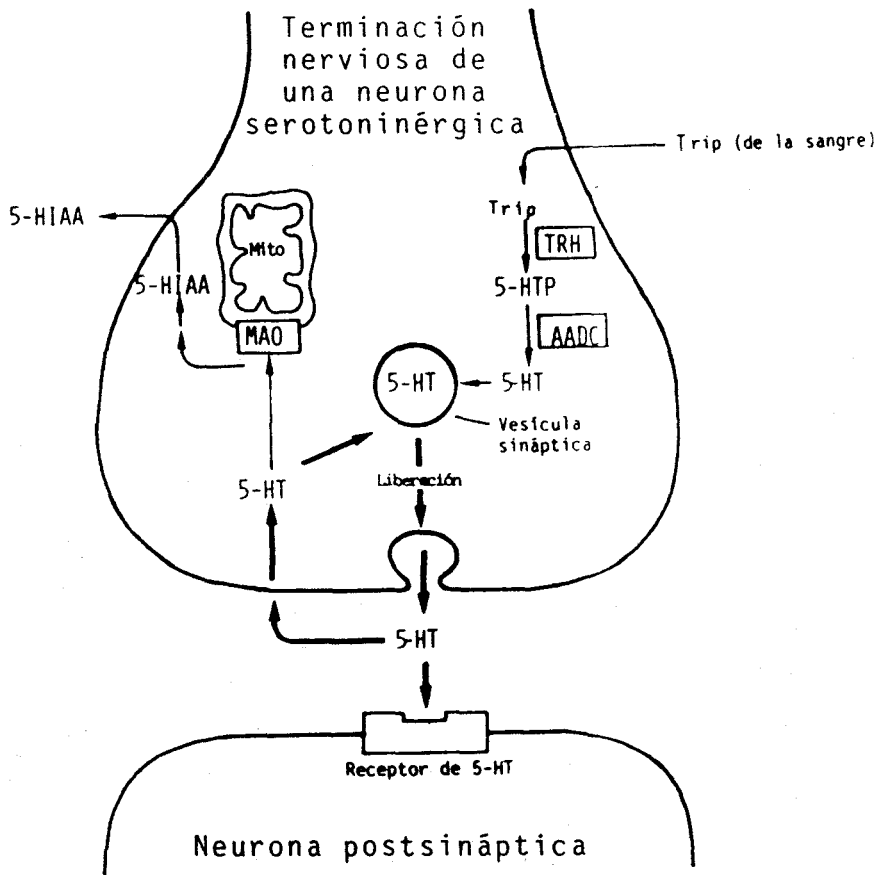


Figura 3. Esquema de una sinapsis serotoninérgica. Trip: triptófano; TRH: triptófano hidroxilasa; 5-HTP: 5-hidroxitriptófano; AADC: L-aminoácido aromático-descarboxilasa (DOPA-descarboxilasa); 5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina); MAO: monoamino oxidasa; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético.

### 1.1.2. Localización, síntesis y degradación de catecolaminas. -

La NA total del cerebro está contenida en algunos miles de células nerviosas, cuyos cuerpos se encuentran en minúsculos núcleos del tronco cerebral (bulbo, protuberancia y pedúnculos). Estas pocas células inervan, sin embargo, toda la corteza cerebral, una gran parte del diencefalo, que está debajo, y el cerebelo (fig. 4). Para conseguir esta inervación debe ramificarse el axón de cada neurona de NA unas 100.000 veces.

El locus coeruleus destaca entre los núcleos neuronales noradrenérgicos y a partir de él se origina una extensa red noradrenérgica ascendente que alcanza todas las capas de la corteza límbica, hipocampo y amígdala, neocórtex y corteza cerebelar, así como el tálamo (Ungerstedt, 1971). Esta catecolamina está presente en cantidades significativas en casi todas las regiones del encéfalo.

Las neuronas dopaminérgicas sólo se encuentran en el cerebro, allí parten de pequeños núcleos del diencefalo e inervan el cuerpo estriado y el prosencéfalo límbico (fig. 4). Participan, entre otras funciones, en el control del movimiento motor (enfermedad de Parkinson).

Las catecolaminas se sintetizan principalmente en las terminaciones nerviosas a partir de L-tirosina procedente de la sangre (figs. 5, 7 y 8). La L-fenilalanina no sirve como sustancia de partida, pues el tejido nervioso, al contrario que otros órganos, no contiene fenilalanina hidroxilasa.

La enzima citosólica L-tirosina hidroxilasa cataliza la hidroxilación de tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esta enzima está dotada de una alta especificidad y necesita para su acción de la presencia como cofactores de un dador de hidrógeno de naturaleza pteridínica

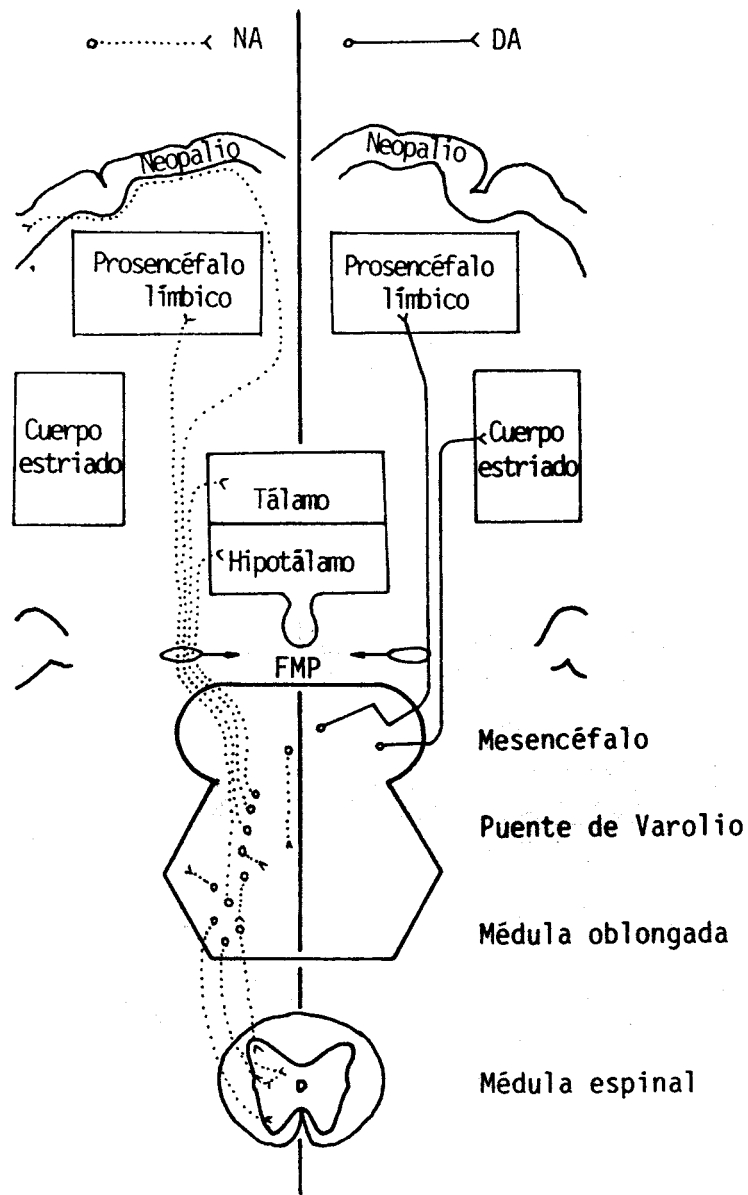


Figura 4. Vías nerviosas noradrenérgicas y dopaminérgicas en el SNC. NA: neuronas noradrenérgicas; DA: neuronas dopaminérgicas; FMP: fasciculus medialis prosencephali.

(tetrahidropterina), a semejanza de lo que ocurre en la oxidación de la fenilalanina, y el ion  $Fe^{++}$  (fig. 5).

En todos los tipos de células que sintetizan catecolaminas, la tirosina hidroxilasa es la enzima que constituye el paso limitante de su velocidad de síntesis (Esplugues, 1983). Los correspondientes productos finales, DA y NA, inhiben la actividad de esta enzima (feedback negativo).

L-DOPA se descarboxila en su cadena lateral a DA mediante la L-aminoácido aromático-descarboxilasa (fig. 5). Esta enzima es mucho menos específica y descarboxila también, por ejemplo, tirosina a tiramina, 5-hidroxitriptófano a 5-HT e histidina a histamina. Se encuentra ampliamente distribuida, aunque su localización es totalmente intraneuronal (Jarrot e Iversen, 1971). La DA se transforma con  $O_2$  y vitamina C mediante dopamina  $\beta$ -hidroxilasa cúprica en NA. La dopamina  $\beta$ -hidroxilasa está localizada en la membrana de las vesículas sinápticas, en las cuales se almacena la NA formada (neurotransmisor). Se trata de una descarboxilasa activa sobre todos los aminoácidos aromáticos, que requiere como cofactor la presencia de fosfato de piridoxal y puede actuar sobre el correspondiente sustrato a una velocidad máxima mil veces superior a la tirosina hidroxilasa.

En las neuronas dopaminérgicas, la DA es el producto final, ya que estas células no contienen dopamina  $\beta$ -hidroxilasa. En cambio, las neuronas noradrenérgicas contienen precisamente esta enzima y la DA existe en estas neuronas sólo como producto intermedio a baja concentración.

La degradación de las catecolaminas está determinada por dos enzimas: la MAO (localizada en las mitocondrias de las terminaciones nerviosas y en otros tejidos como el hígado) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (localizada en las membranas postsinápticas) (figs. 5-8). La MAO, que



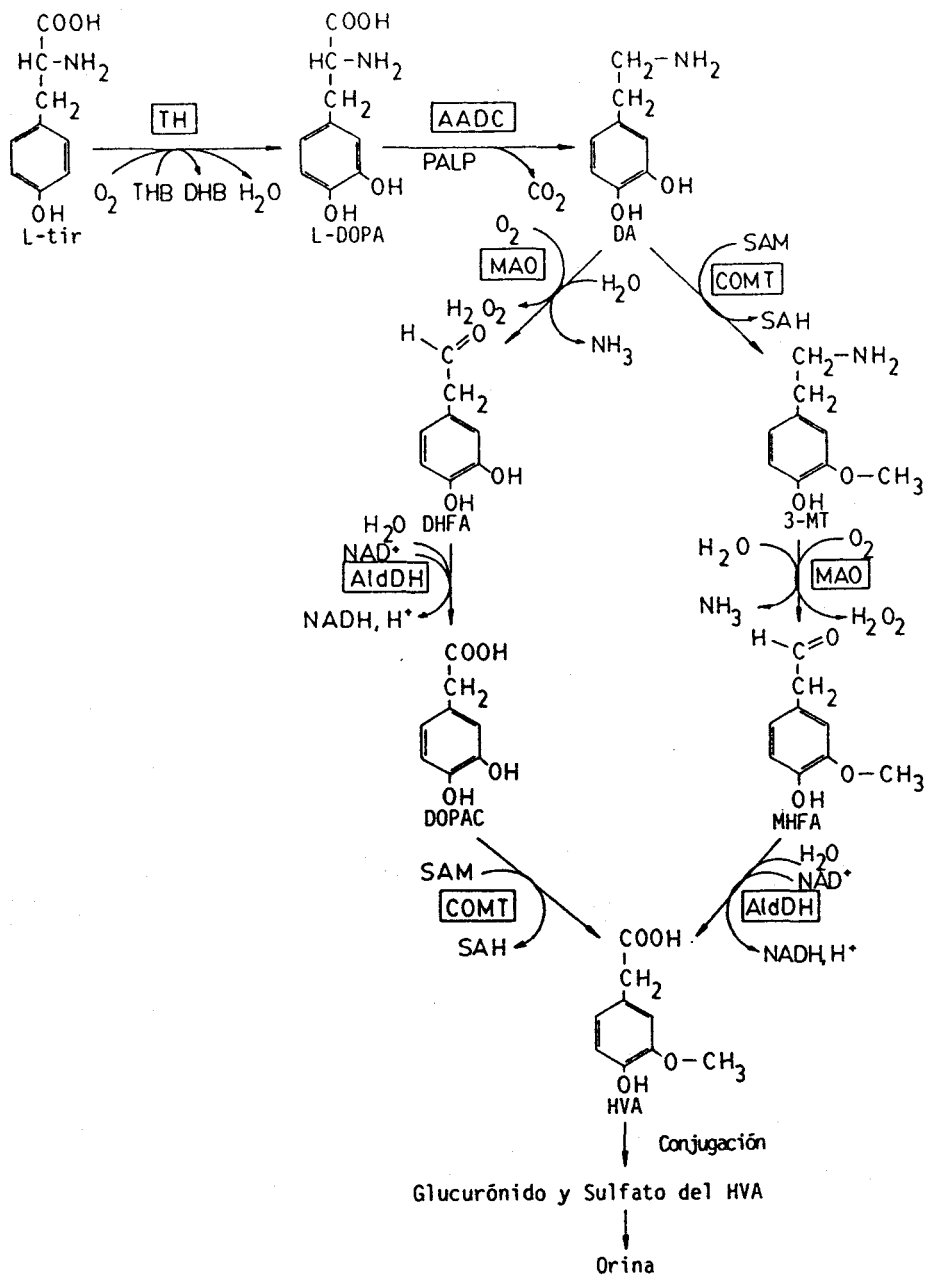


Figura 5. Síntesis y degradación de la dopamina (DA). L-tir: L-tirosina; TH: tirosina hidroxilasa; T(D)BH: tetra(d)hidrobiopterina; L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina; AADC: L-aminoácido aromático-d Descarboxilasa (DOPA-d Descarboxilasa); PALP: piridoxalfosfato; MAO: monoamino oxidasa; COMT: catecol-O-metil transferasa; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; DHFA: 3,4-dihidroxifenilacetaldehido; 3-MT: 3-metoxitiramina; AldDH: aldehído deshidrogenasa; DOPAC: 3,4-dihidroxifenilglicol; MHFA: 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehido; HVA: ácido homovanílico.

contiene FAD unido covalentemente y que está localizada en la membrana exterior de las mitocondrias, cataliza la desaminación oxidante con  $O_2$  de las catecolaminas con formación de  $H_2O_2$  y  $NH_3$ . La COMT citoplasmática cataliza los procesos de transmetilación en los que actúa la S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilos. La transmetilación se realiza sobre los grupos hidroxilos en posición meta de las catecolaminas, aunque también puede llevarse a cabo sobre un átomo de oxígeno correspondiente a uno de los grupos hidroxilos de la molécula, preferentemente los localizados en posición tres. Ni COMT ni MAO son muy específicas. La MAO, por ejemplo, desamina también aminas como la 5-HT, la histamina o la triptamina.

La NA se desamina dentro de las terminaciones nerviosas mediante la MAO y se reduce mediante la aldehído reductasa a 3,4-dihidroxifenilglicol (figs. 6 y 7). Este producto de degradación se libera y se supone que se metila en las células neuróglícas que, al contrario que las terminaciones nerviosas, contienen muchísima COMT, formando 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), principal producto de degradación de NA en el SNC que se conjuga con sulfato en el SNC. La concentración de MHPG en la orina no refleja, sin embargo, la actividad de las neuronas noradrenérgicas en el SNC, puesto que este glicol, si bien como producto secundario, se forma también en la degradación de NA en neuronas noradrenérgicas del sistema nervioso periférico. Sólo el 30 por 100 aproximadamente de MHPG de la orina procede del SNC (Sharman, 1973; Langer, 1974).

La mayor parte de la NA que llega a la circulación sanguínea (es decir, la NA que se libera en las sinapsis por excitación de neuronas noradrenérgicas del simpático; y además la procedente de la médula suprarrenal en casos de stress) se metila primeramente en el hígado mediante COMT y luego se desamina por oxidación mediante MAO y se degrada a

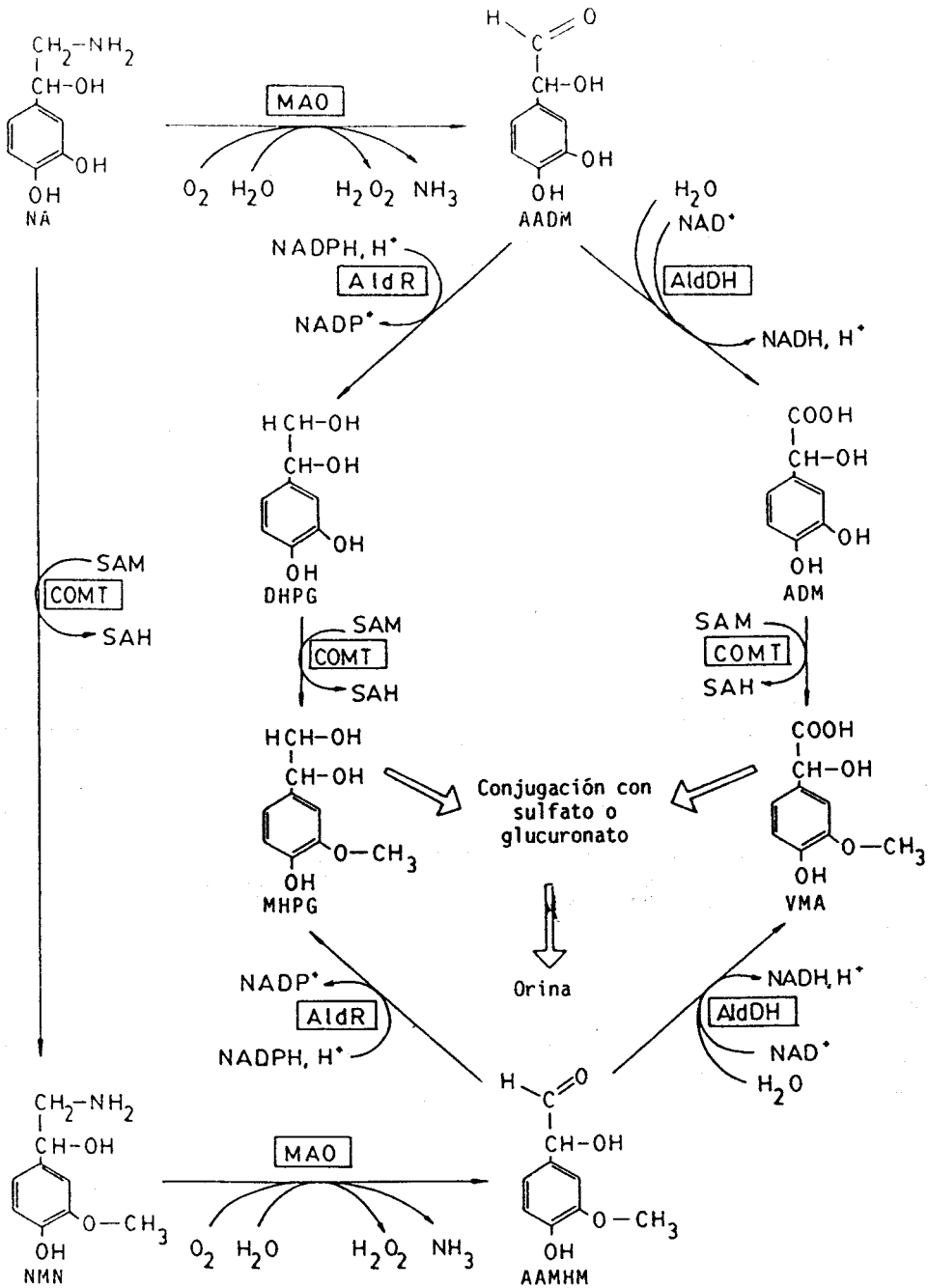


Figura 6. Degradación de noradrenalina (NA). MAO: monoamino oxidasa; AADM: aldehído del ácido 3,4-dihidroximandélico; AldDH: aldehído deshidrogenasa; AldDR: aldehído reductasa (además de la AldDR puede catalizar este paso en pequeña medida la alcohol deshidrogenasa con NADH); ADM: ácido 3,4-dihidroximandélico; DHPG: 3,4-dihidroxifenilglicol; COMT: catecol-O-metil transferasa; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; VMA: ácido vanililmandélico; MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; NMN: normetanefrina; AAMHM: aldehído del ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico.

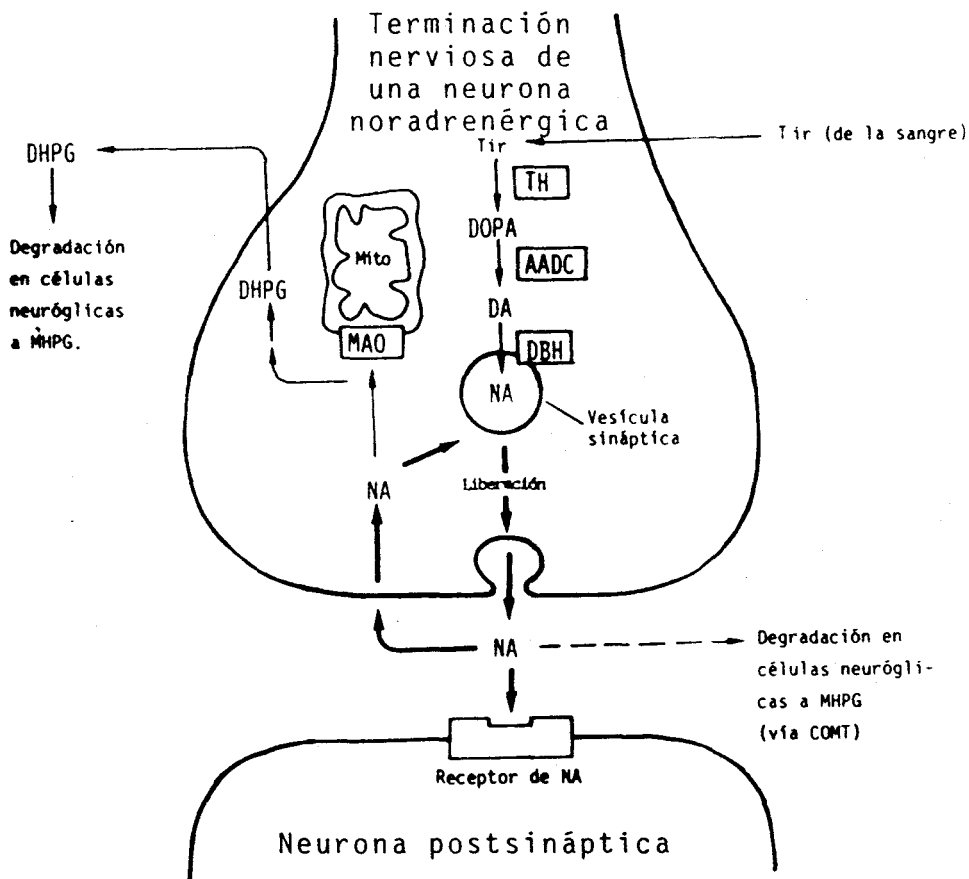


Figura 7. Esquema de una sinapsis noradrenérgica (SNC). La noradrenalina (NA) se sintetiza a partir de L-tirosina (Tir) pasando por L-dihidroxifenilalanina (DOPA) y dopamina (DA). TH: tirosina hidroxilasa; AADC: L-aminoácido aromático-descarboxilasa (DOPA-descarboxilasa); COMT: catecol-O-metil transferasa; MAO: monoamino oxidasa; DHPG: dihidroxifenilglicol; MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol.

ácido vanillilmandélico (VMA) (fig. 6). El VMA se conjuga en el hígado y se elimina con la orina.

En todos los casos intervienen conjugasas que conducen a la formación de sulfatos o glucuronatos de algunos de los catabolitos, en especial, de la normetanefrina.

Los principales metabolitos que aparecen en la orina son el VMA, el MHPG y los derivados O-metilados de las catecolaminas en forma libre o conjugados como sulfatos o glucuronatos.

La DA puede ser degradada mediante dos vías metabólicas que dan el mismo producto final, el ácido homovanílico (HVA), que es su principal metabolito (fig. 5). La primera vía metabólica, por la actuación de la MAO que forma 3,4-dihidroxifenilacetaldehído y de la aldehído deshidrogenasa, produce DOPAC y éste da lugar a HVA por medio de la COMT. En la segunda vía interviene primero la COMT para producir 3-metoxitiramina, luego la MAO dando 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehído y, por último, la aldehído deshidrogenasa para producir HVA (fig. 5). De los sistemas enzimáticos, es la MAO la que tiene una actividad más potente sobre la DA, que encuentra en ella su mejor sustrato.

El producto de degradación, HVA, llega a la sangre a través del líquido cerebroespinal y se conjuga en el hígado. Así mismo, la conjugación con sulfato tiene lugar parcialmente en el cerebro.

## 1.2. Vía visual.-

### 1.2.1. Serotonina.-

La importancia de la 5-HT y sus metabolitos en la vía visual ya ha sido establecida, pero su significado fisiológico no se conoce completamente.

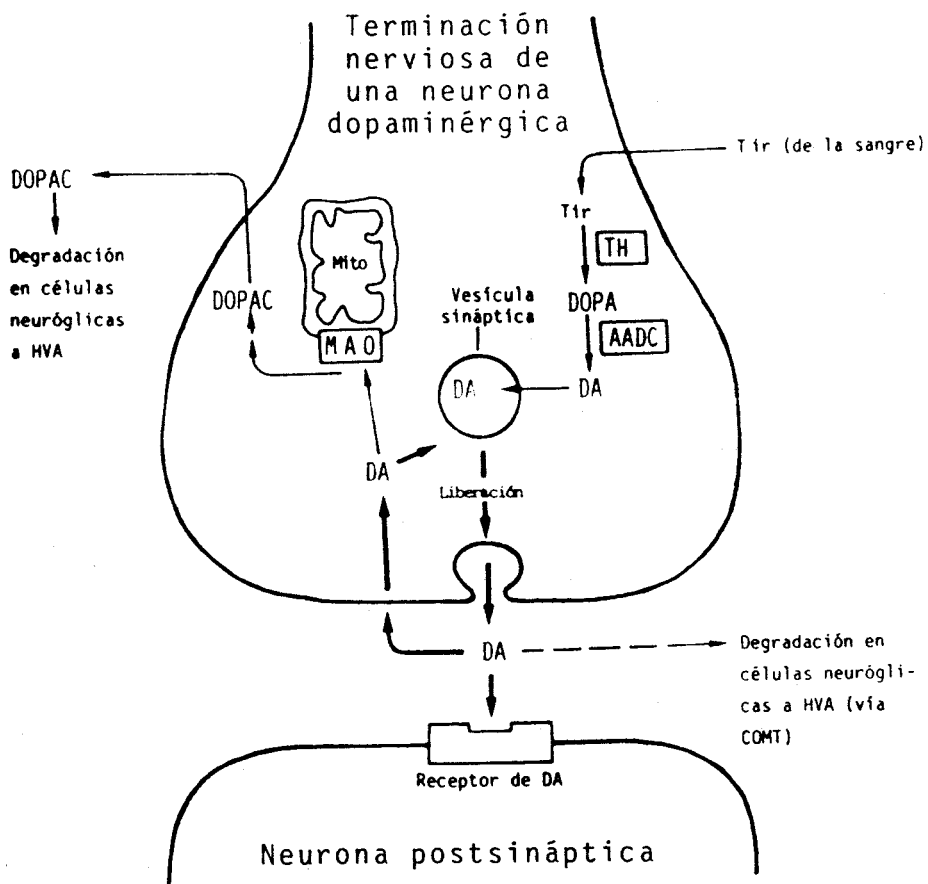


Figura 8. Esquema de una sinapsis dopaminérgica. La dopamina (DA) se sintetiza a partir de L-tirosina (L-tir) pasando por la L-dihidroxitirosina (DOPA). TH: tirosina hidroxilasa; AADC: L-aminoácido aromático-descarboxilasa (DOPA-descarboxilasa); MAO: monoamino oxidasa; COMT: catecol-O-metil transferasa; DOPAC: dihidroxitirosina; HVA: ácido homovanílico.

Se ha estudiado la morfología y el contenido en neurotransmisores de diferentes clases de células (Brecha et al., 1979; Karten y Brecha, 1980; Morrison et al., 1982), lo que ayuda en la interpretación de las interacciones neuronales durante los procesos de información visual. Sin embargo, la determinación cuantitativa de la serotonina y sus metabolitos se ha estudiado poco en los centros visuales y sólo se han publicado cambios en el contenido de 5-HT durante el desarrollo (Cano y Reinoso-Suárez, 1982), restringiéndose estos datos únicamente a los niveles de esta indolamina, por lo que sería interesante conocer también los niveles de sus metabolitos con el fin de conseguir conclusiones más significativas.

El envejecimiento está asociado con un progresivo deterioro del sistema nervioso central. Aunque parecen ser más deteriorativos los cambios asociados con la edad en los órganos sensoriales periféricos, también se han buscado cambios relacionados con la edad en un número de aspectos del sistema ocular que puedan dar una explicación a tal deterioro funcional (Bowden y Willians, 1984; Cano et al., 1986).

Recientemente ha aumentado el interés por el estudio de las posibles alteraciones que tienen lugar en los neurotransmisores de tejidos animales 'envejecidos' (Pradham, 1980; Roth y Hess, 1982). Está bien establecido que en el envejecimiento de mamíferos el sistema central catecolaminérgico está particularmente afectado, como se ha indicado por la disminución en la actividad tirosina hidroxilasa (McGeer et al., 1971a; Finch, 1976; McGeer et al., 1977). Por el contrario, los efectos del envejecimiento sobre la 5-HT no se han estudiado con tal extensión y los trabajos disponibles son contradictorios (Robinson et al., 1972; Nies et al., 1973; Samorajski y Rolsten, 1973; Simpkins et al., 1977). Sin embargo, hay que hacer resaltar

que la 5-HT se ha examinado más extensamente en los ganglios basales, pues las variaciones de su concentración parecen estar involucradas en la enfermedad de Parkinson (Robinson et al., 1972; MacKay et al., 1978).

### 1.2.2. Catecolaminas. -

La temprana aparición de los sistemas de neuronas monoaminérgicas en el SNC de mamíferos (Golden, 1973; Nobin y Björklund, 1975; Patel et al., 1977) ha permitido especular que tienen una función reguladora durante el desarrollo del cerebro (Seiger y Olson, 1971; Lauder y Bloom, 1974; Lauder y Krebs, 1976). Además, estudios farmacológicos y de comportamiento sugieren que las neuronas centrales dopaminérgicas y noradrenérgicas son, hasta cierto punto funcionales a los pocos días del nacimiento (McGeer et al., 1971b).

Se cree que la distribución regional de catecolaminas refleja la densidad de terminales en estas áreas, porque los transmisores están mayoritariamente concentrados en las varicosidades terminales de las neuronas catecolaminérgicas (Dahlström y Häggendal, 1966). Por lo que la concentración de estas monoaminas en el sistema visual nos puede dar información acerca del grado de inervación noradrenérgica y dopaminérgica en estas estructuras visuales durante el desarrollo y el envejecimiento.

El sistema visual ha sido extensamente utilizado como modelo para estudiar la plasticidad del cerebro de mamíferos durante el desarrollo y existe una creciente controversia con respecto al papel que pueden ejercer las catecolaminas en la plasticidad de este sistema durante el desarrollo (Kasamatsu y Pettigrew, 1976; Kasamatsu y Pettigrew, 1981; Adrien et al., 1982; Bear y Daniels, 1983; Daw et al., 1985; Bear y Singer, 1986).



En el llamado 'periodo crítico', durante los tres primeros meses de vida, el sistema visual muestra una notable capacidad para reorganizar sus modelos de conexión funcional. Este proceso da lugar a grandes cambios en la distribución cortical de las fibras talámicas que modulan los estímulos procedentes de la retina y que sólo suceden en el periodo crítico. Durante este periodo se han encontrado cambios en el contenido de 5-HT durante el desarrollo postnatal en la vía visual (Cano y Reinoso-Suárez, 1982). Para examinar el papel de las catecolaminas, varios autores han utilizado 6-hidroxidopamina (Pettigrew y Kasamatsu, 1978; Kasamatsu y Pettigrew, 1979; Bear et al., 1983; Bear y Singer, 1986), neurotoxina específica que es captada por el líquido cerebroespinal por los axones que contienen NA y DA y que produce su destrucción (Bloom et al., 1969).

En este trabajo, con el fin de profundizar más en el conocimiento del papel de las catecolaminas en el sistema visual, empleamos otra aproximación diferente que consiste en estudiar los niveles de NA y DA junto con sus metabolitos durante el desarrollo postnatal en diferentes estructuras visuales del cerebro. Aunque existe un método fluorimétrico para la medida de catecolaminas, pero tiene el problema de la falta de sensibilidad necesaria para medir las aminas biógenas en pequeñas cantidades de tejido y en las bajas concentraciones encontradas en la rata recién nacida. Sin embargo, la aplicación de cromatografía líquida de alta eficiencia combinada con un detector electroquímico (HPLC-ED) ha aumentado enormemente la selectividad y sensibilidad en la determinación de aminas biógenas y sus metabolitos en tejido cerebral.

### 1.2.3. Enucleación. -

Una de las técnicas más ampliamente usadas para el estudio los procesos de desarrollo del cerebro es la modificación del ambiente sensorial de un organismo en desarrollo mediante la deprivación sensorial.

La deprivación visual afecta el desarrollo de modelos dendríticos e inervación axonal en varias áreas del sistema visual.

La enucleación elimina todos los estímulos sensoriales al sistema visual, sin embargo, las diferentes áreas cerebrales de la vía visual responden de manera diferente a la deprivación. La importancia del estímulo aferente a una población neuronal y a neuronas individuales ha sido tratado con gran interés. En la maduración del sistema nervioso, estudios del efecto de la desaferenciación se han realizado para descubrir el papel del estímulo aferente en el mantenimiento de la neurona madura, es decir, qué efecto trófico tiene sobre las células postsinápticas (Cowan, 1970; Guillery, 1974; Smith, 1977).

Poco se conoce sobre los efectos de la deprivación sensorial en los neurotransmisores en el sistema visual.

La 5-HT parece ser uno de los transmisores del sistema visual, está presente en los axones terminales del geniculado lateral y del colículo superior de rata (Fuxe, 1965). Esta indolamina desempeña un efecto inhibitor en las neuronas del geniculado (Tabecis y DiMaria, 1972) y en el colículo superior (Straschill y Perwein, 1971). Poco se conoce sobre su función en el sistema visual y sobre los efectos de la deprivación sensorial en su concentración en varias estructuras de la vía visual.

Lai et al. (1978) han encontrado cambios en la concentración de 5-HT en la corteza visual, no encontrando variación de ella en el geniculado lateral ni colículo

superior, sugiriendo que el desarrollo serotoninérgico en estas estructuras es independiente del estímulo óptico. Estas áreas visuales están inervadas por el rafe. En la rata, las neuronas de este núcleo se desarrollan en el periodo embrionario (Lauder y Bloom, 1974) y antes que la neurogénesis en el sistema visual. El desarrollo de las fibras ópticas es muy tardío en la rata, algunos axones de las células ganglionares, en la rata recién nacida, no han alcanzado el disco óptico (Morest, 1970).

En comparación con otros neurotransmisores, la 5-HT se caracteriza por un número relativamente alto de axones terminales y una baja densidad de sinapsis. Evidencias existentes sugieren que esta monoamina puede ser una sustancia neurohumoral moduladora liberada por ciertas varicosidades no-sinápticas varicosidades (Calas et al., 1978; Chan-Palay, 1976; Léranth et al., 1984, Richards et al., 1973).

Las catecolaminas juegan un papel importante en la regulación de la plasticidad en el periodo crítico (Pettigrew y Kasamatsu, 1978).

Existen evidencias de que el estímulo noradrenérgico tiene una influencia en la sinaptogénesis en la corteza visual, pero esto parece ocurrir como una influencia sinaptogénica inhibitoria transitoria restringida a la primera semana de vida (Blue y Parnavelas, 1982). Steveni et al. (1972) han reportado que la enucleación puede no cambiar la inervación noradrenérgica al geniculado lateral y al colículo superior en la rata.

Sin embargo, Rhoades y Hess (1983) han mostrado un incremento de la inervación noradrenérgica en el estratum griseum superficiale, y en el estratum óptico del colículo superior después de la enucleación en el hamster adulto.

Estudios de degeneración después de la enucleación muestran que el sistema visual es principalmente cruzado en

la rata, extendiéndose al 95% de las fibras retinianas (Hayhow et al., 1962). Por lo cual nosotros hemos realizado un estudio del efecto de la bienucleación en la vía visual geniculada y extrageniculada. Primero, cuantificado la concentración de las aminos biógenas y sus metabolitos y después, mediante un estudio ultraestructural del geniculado lateral.

### 1.3. Núcleo caudo-putamen. -

El núcleo caudado, el putamen y el globus pálido son grandes masas de sustancia gris anatómicamente distintas que se encuentran en la base del cerebro y que son colectivamente denominados ganglios basales. Los dos primeros constituyentes forman el estriado o neostriado, y la parte externa e interna del globus pálido son conocidos como paleostriado. Este sistema estriopalidal es una unidad integradora cuyas partes constituyentes tienen muchas conexiones entre ellas y con otras regiones del cerebro. En su totalidad esto es equivalente al sistema extrapiramidal, que comprende las estructuras del cerebro, excepto la corteza cerebral, las cuales mandan fibras eferentes a la médula espinal. Entre las funciones del cuerpo reguladas por el sistema extrapiramidal se encuentran el tono y la postura de los miembros.

Investigaciones bioquímicas y farmacológicas sobre la naturaleza de los desórdenes extrapiramidales han conducido a asignar el papel de estructura nodal al neostriado. Dentro del neostriado, el núcleo caudo-putamen es una estructura de gran importancia en la rata. Este núcleo recibe conexiones aferentes y eferentes de varias áreas cerebrales, incluyendo el globus pálido, tálamo, núcleos subtalámicos y sustancia nigra. La importancia de elucidar las conexiones sinápticas y los transmisores químicos es

ilustrada por los cambios encontrados en distintas enfermedades. Los ganglios basales están implicados en el control de la locomoción, además el sistema estriopalidal está relacionado con el movimiento de giro de la cabeza.

Parece ser que la DA y su interacción con otras aminas biógenas desempeñan un papel esencial en el control de los movimientos complejos. Por lo que su estudio es de gran importancia debido a que se han descrito cambios en las aminas biógenas en algunas enfermedades, algunas de ellas relacionadas con la edad, por ejemplo, se ha encontrado una disminución en la concentración de las monoaminas con la enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 1966; De Ajuriaguerra y Gauthier, 1971; Kopin, 1972; Sourkes, 1973) y en los niveles de DA y HVA en el estriado en la enfermedad de Huntington (Bernheimer et al., 1973). Por lo que debido a la importancia de esta estructura existe una gran variedad de trabajos (Revisión de Graybiel y Ragsdale, 1983).

Todos los estudios que se han realizado en este núcleo han sido preferentemente en el individuo adulto y no se ha realizado ningún estudio sistemático del contenido de estas monoaminas durante el desarrollo y el envejecimiento.

A las aminas biógenas se les ha asignado en el cerebro muchos posibles papeles, así, la 5-HT desempeña un papel en la regulación endocrina, está implicada en la regulación de la temperatura, en la percepción sensorial, en la iniciación del reposo nocturno y mantiene la actividad del crecimiento, desarrollo y envejecimiento (Walker y Timiras, 1981). Además se ha indicado que las catecolaminas pueden jugar algún tipo de influencia 'trófica' o 'plástica' en el desarrollo del cerebro (Kasamatsu y Pettigrew, 1979).

El SNC sufre alteraciones durante el desarrollo y el envejecimiento tanto en su estructura, como en su bioquímica y función. Sin embargo, con el conocimiento actual del envejecimiento sólo podemos elaborar teorías que necesitarán

futuras verificaciones (Timiras y Bignani, 1976; Timiras, 1978; Timiras et al., 1979; Walker y Timiras, 1981). Alguna de las razones por las que no se ha establecido el papel central del SNC y el de los neurotransmisores en estos procesos, refleja las dificultades prácticas y teóricas en la identificación y medida de neurotransmisores en regiones cerebrales; así como el recambio de éstos y sus implicaciones funcionales. Para un mayor conocimiento de estos transmisores en el núcleo caudo-putamen hemos medido las aminos biógenas y sus principales metabolitos mediante HPLC-ED que permite una alta sensibilidad a la hora de detectar pequeñas concentraciones de estas aminos, con las que podemos realizar un estudio exhaustivo de los posibles cambios metabólicos e interacciones entre ellas durante el desarrollo y el envejecimiento.

#### 1.4. Hipocampo. -

Existen numerosos trabajos que demuestran que los axones que contienen acetilcolina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, DA, NA y 5-HT, así como otros neurotransmisores, inervan el hipocampo (Azmitia, 1978; Fonnun y Storm-Mathisen, 1978; Lewis y Shute, 1978; Lindvall y Björklund, 1978; Ishikawa et al., 1982).

El hipocampo es una región cerebral con una pequeña inervación dopaminérgica. Se conoce que la actividad dopaminérgica está implicada en la vía septo hipocampal (Robinson et al., 1979; Costa et al., 1983). Los receptores de DA en el hipocampo de rata pueden modular la formación de la memoria (Honza et al., 1984).

La inervación noradrenérgica del hipocampo se origina exclusivamente a partir del locus coeruleus. La máxima concentración de fibras noradrenérgicas se encuentra en la región hilar del giro dentado. Su inervación serotoninérgica

deriva principalmente de la región medial del núcleo del rafe (área B<sub>3</sub>), recibe también fibras del núcleo dorsal del rafe (área B<sub>2</sub>), especialmente su porción dorsomedial, y de la porción caudal del rafe dorsal (área B<sub>1</sub>). Esta indolamina es uno de los principales neurotransmisores en el hipocampo (Moore, 1975) y parece estar más uniformemente distribuida en esta estructura que la NA.

Se ha sugerido que la NA en el cerebro está involucrada en los mecanismos de actividad motora, percepción del dolor, aprendizaje y memoria, etc. (Kety, 1972; Gage et al., 1978; Flicker y Geyer, 1982), pero en muchos de estos fenómenos juega un papel facilitatorio. Poco se conoce acerca del papel del sistema serotoninérgico en el hipocampo. Sin embargo, existen evidencias de que la 5-HT tiene un efecto inhibitor en la actividad de sus neuronas, EEG cortical, actividad motora, aprendizaje y memoria y percepción del dolor (Segal, 1976; Gage y Springer, 1981). Además, se ha indicado que la inyección de 5-HT produce en el hipocampo un aumento en la actividad motora (Gage y Springer, 1981) y en la liberación de NA (Feuerstein y Hertting, 1986).

Las terminales noradrenérgicas y serotoninérgicas se encuentran en estrecho contacto en el hipocampo (Storm-Mathisen, 1977), por lo que se puede asumir que representan la base anatómica para posibles interacciones funcionales entre ambos neurotransmisores. Recientemente, algunas investigaciones han indicado que estos dos neurotransmisores desempeñan un papel antagonista en esta estructura (Plaznik et al., 1983).

En el giro dentado de jóvenes existe una gran plasticidad (Cotman y Scheff, 1979), además, en los roedores se pueden formar nuevas neuronas granulares hasta después de los seis meses postnatales (Kaplan y Bell, 1983). La alteración en el metabolismo de las monoaminas, la cual puede ocurrir en el cerebro durante el envejecimiento, es de

un gran interés debido al incremento de la incidencia de la enfermedad de Alzheimer en la senectud.

Teniendo en cuenta, tanto la plasticidad del hipocampo durante el desarrollo postnatal, como el reciente trabajo que indica que se produce un fallo en el metabolismo de las monoaminas en algunas enfermedades relacionadas con esta área cerebral (Perry y Perry, 1982). Es por lo que estudios de las aminas biógenas durante el desarrollo y el envejecimiento pueden ilustrar las posibles consecuencias en el comportamiento que resultan de fallos en el metabolismo de las monoaminas en el sistema hipocampal.

#### 1.5. Objetivos. -

1.5.1. Puesta a punto de la técnica de medida de las aminas biógenas y sus metabolitos por HPLC-ED.

1.5.2. Medida de las aminas biógenas durante el desarrollo (0, 8, 15, 30 y 90 días) y el envejecimiento (6, 12, 24 y 30 meses) en las distintas estructuras del sistema visual (geniculado lateral, corteza visual, colículo superior y tálamo posterior)

1.5.2.1. Estudio de la serotonina y sus metabolitos (triptófano, 5-hidroxitriptófano, ácido 5-hidroxiindolacético y 5-hidroxitriptofol).

1.5.2.2. Estudio de la noradrenalina y sus metabolitos (3-metoxi-4-hidroxifenilglicol y normetanefrina)

1.5.2.3. Estudio de la dopamina y sus metabolitos (DOPAC, 3-metoxitiramina y ácido homovanílico).

1.5.3. Efecto de la bienucleación en el desarrollo de las aminas biógenas.

1.5.3.1. Estudio de la serotonina y sus metabolitos a los 8, 15, 30, 90 y 180 días.



1.5.3.2. Estudio de la noradrenalina y sus metabolitos a los 8, 15, 30, 90 y 180 días.

1.5.3.3. Estudio de la dopamina y sus metabolitos a los 8, 15, 30, 90 y 180 días.

1.5.4. Estudio ultraestructural del geniculado lateral de ratas bien nucleadas.

1.5.5. Medida de las aminas biógenas (serotonina, noradrenalina y dopamina) y sus metabolitos durante el desarrollo y envejecimiento del núcleo caudado-putamen.

1.5.6. Medida de las aminas biógenas y sus metabolitos durante el desarrollo y el envejecimiento del hipocampo.

## 2. MATERIAL Y METODOS. -

### 2.1. Animales de experimentación. -

Se han usado ratas macho tipo Wistar para estudiar el desarrollo y envejecimiento de distintas estructuras cerebrales: vía visual, núcleo caudo-putamen e hipocampo; utilizando de cuatro a nueve ratas en cada uno de los estadios siguientes: 0, 8, 15, 30, 90 y 180 días y 12, 24 y 30 meses. Durante los seis primeros meses, también, se estudió el efecto de la enucleación en el desarrollo de la vía visual.

Los animales se criaron en el laboratorio, la camada se ajustó a nueve crías, siendo destetadas a los 21 días y separándolas a tres animales por jaula. Tuvieron agua y comida ad libitum, con la temperatura controlada entre 22 y 25°C. y bajo un ritmo normal de luz y oscuridad.

Para evitar los posibles cambios causados por el ritmo circadiano en los niveles de aminos biógenas, los animales se decapitaron entre las 10.00 y las 12.00 horas de la mañana. Se les extrajo rápidamente el cerebro que se diseccionó en frío obteniendo las estructuras visuales (geniculado lateral, colículo superior, tálamo posterior y corteza visual), el núcleo caudo-putamen y el hipocampo como se indica en las figuras 9, 10 y 11. Todos estos centros se pesaron en una balanza de precisión Metler hasta la décima de milígramo (5-150 mg.) y se conservaron a -70°C. hasta ser analizados.

### 2.2. Productos y reactivos. -

Se utilizaron los siguientes patrones: L-triptófano (Trip), 5-hidroxi-L-triptófano (5-HTP), 5-hidroxitriptamina

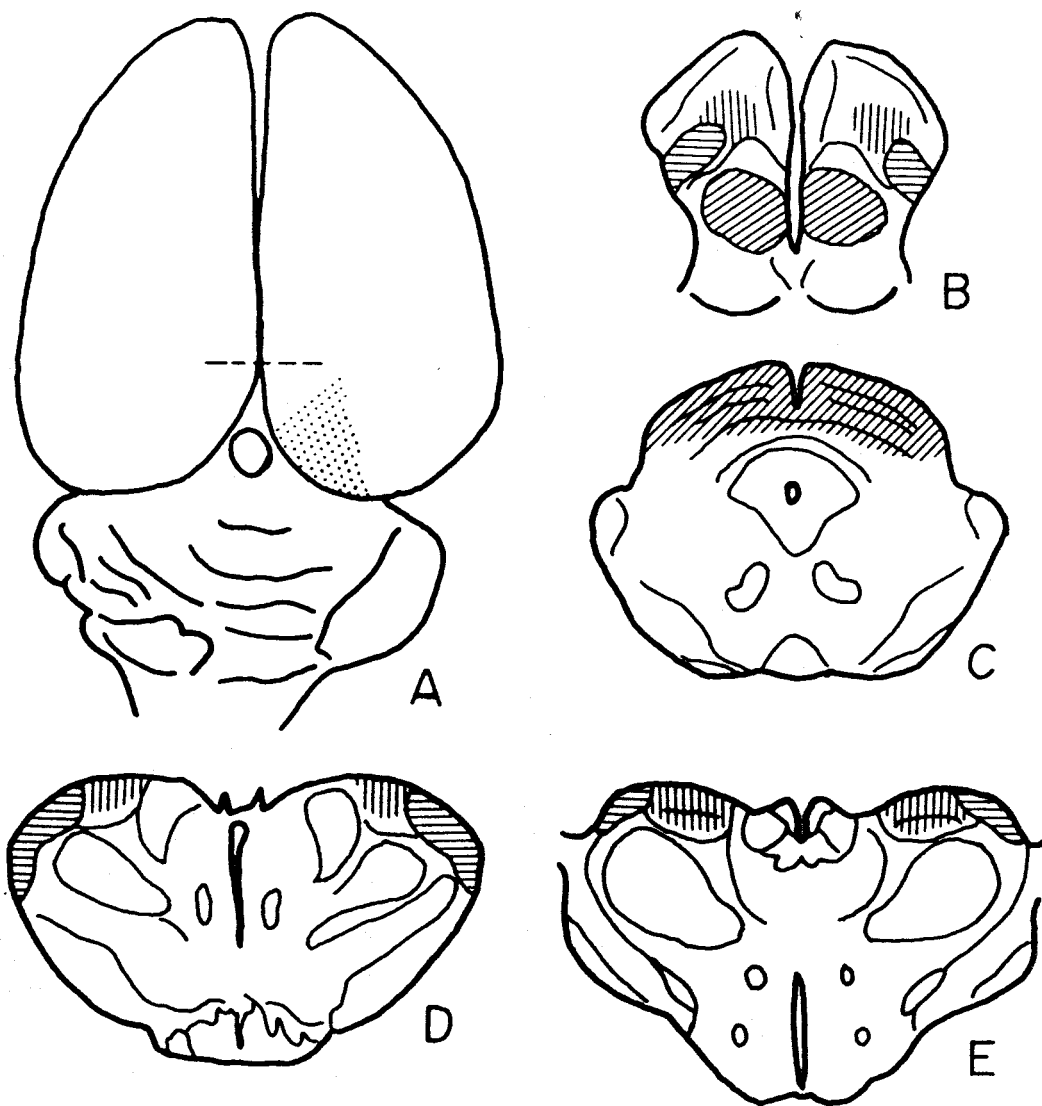


Figura 9. Representación esquemática de las áreas visuales diseccionadas. A: diagrama de una vista dorsal del cerebro de rata. El área punteada representa la zona disecada que corresponde a las áreas 17 y 18 de la corteza cerebral de rata. La línea discontinua representa la localización del esplenium del cuerpo calloso. B: diagrama de una vista dorsal del mesencéfalo y diencefalo de la rata después de quitar la corteza cerebral. Las líneas sombreadas representan las estructuras disecadas. Líneas oblicuas, colículo superior; líneas horizontales, geniculado lateral; y líneas verticales, tálamo posterior. C-E: diagramas de secciones frontales del mesencéfalo y diencefalo de rata mostrando las áreas disecadas en líneas sombreadas (el código es similar al del apartado B). En todos los casos en los que fue disecado el tálamo posterior, también estuvo incluida la porción caudal del núcleo lateral dorsal.

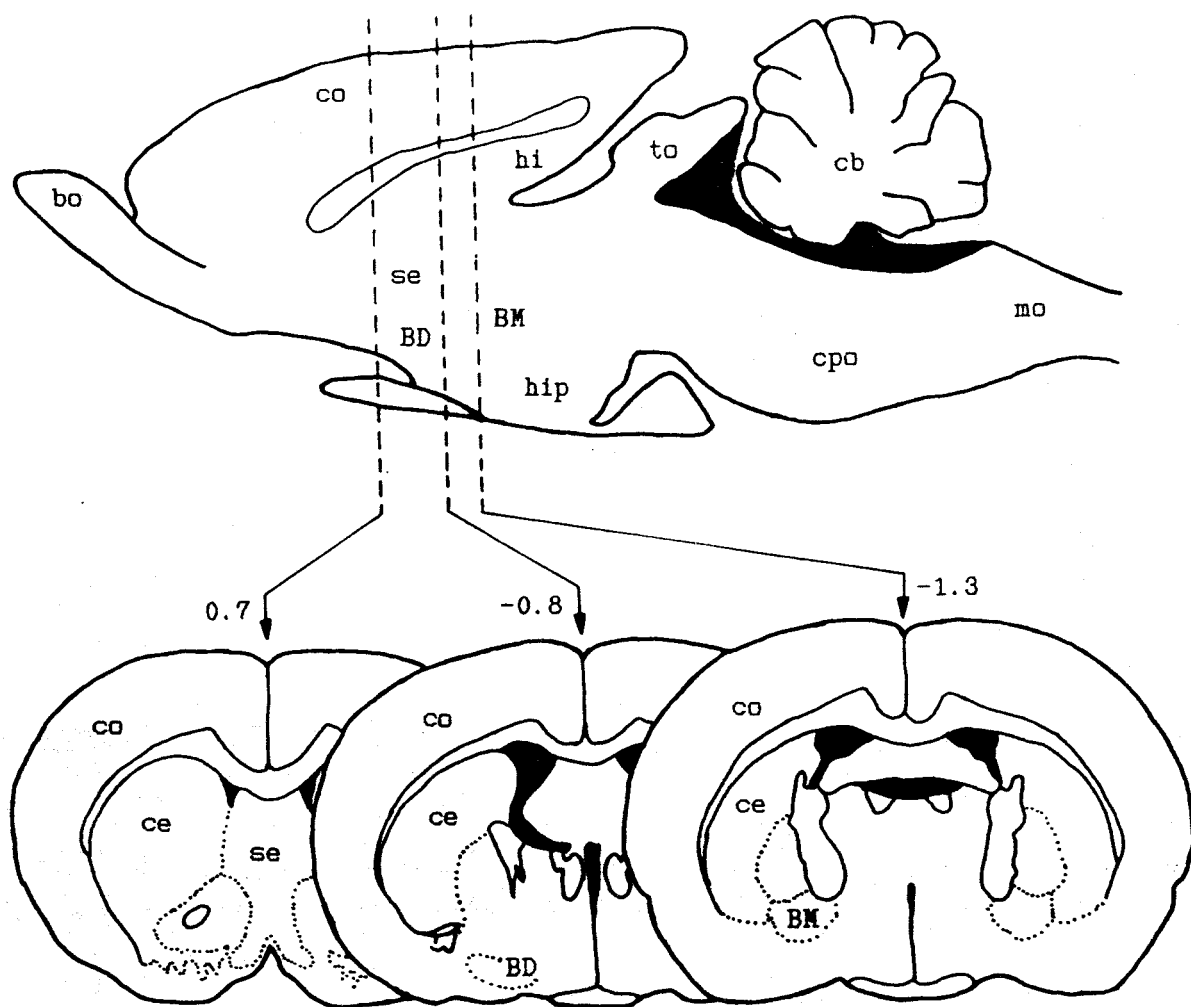


Figura 10. Representación esquemática del cerebro de rata en el que podemos observar el núcleo caudo-putamen (cp). Los espacios ventriculares se muestran en negro. Las líneas discontinuas en la sección transversa indican las regiones diseccionadas. Los números indican la distancia en mm. desde el punto bregma. BM: núcleo basal de Meynert; cb: cerebelo; co: neocortex; BD: banda diagonal de Broca; cpo: cerebro posterior; hi: hipocampo; hip: hipotálamo; mo: médula oblongada; bo: bulbo olfatorio; se: septum; ce: cuerpo estriado; to: tecto óptico.

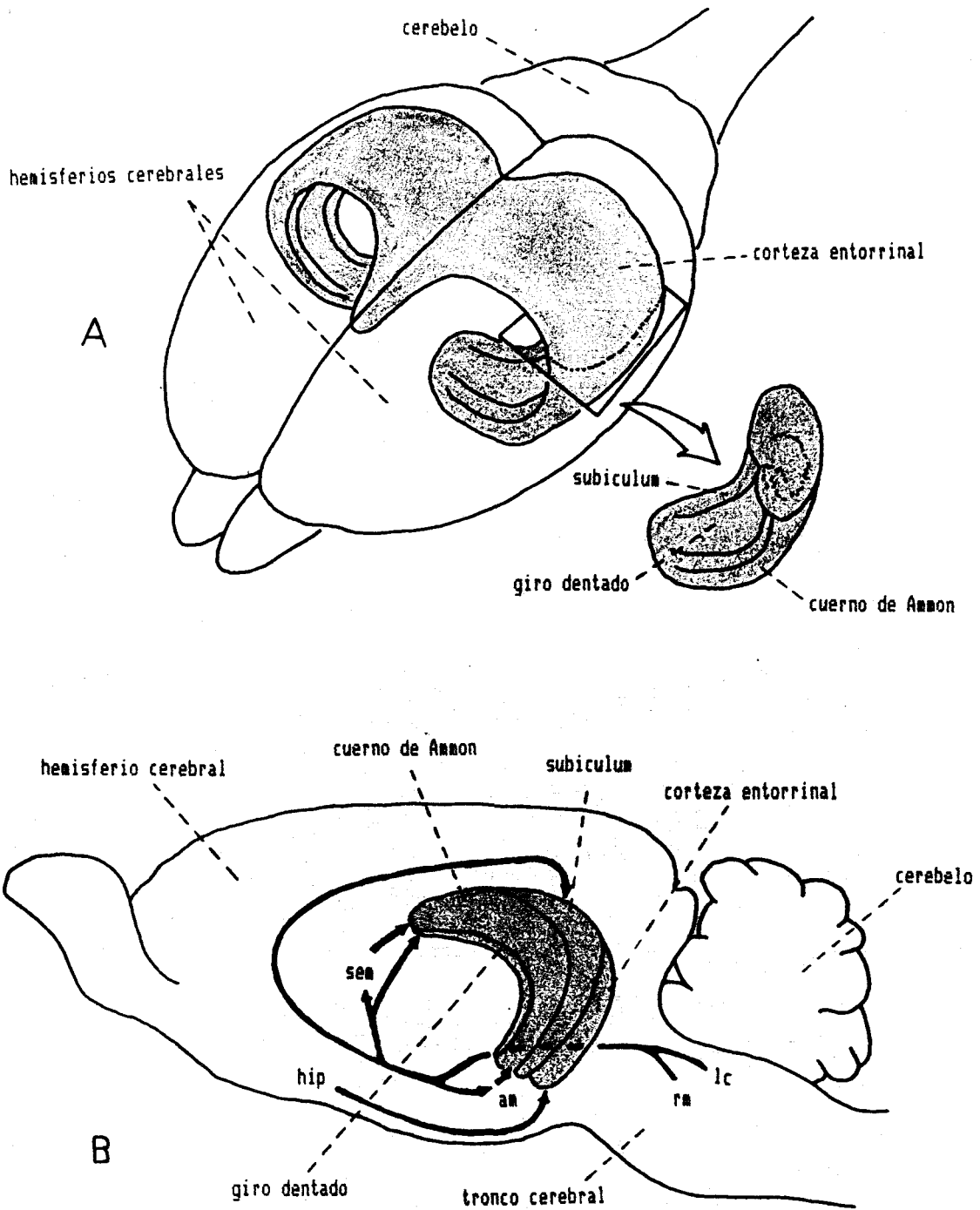


Figura 11. Representación esquemática del cerebro de rata en el que podemos observar el hipocampo (estructura sombreada). A. Forma de los dos hipocampos vistos por transparencia en el interior de los hemisferios cerebrales. B. Corte longitudinal a través del hemisferio cerebral, lo que permite situar la posición del hipocampo, así como los principales circuitos de diversas estructuras (flechas negras). am: amígdala, hip: hipotálamo, lc: locus coeruleus, rm: rafe medial, sem: septo medial.

(5-HT), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA), 5-hidroxi-triptofol (5-Htriptofol), L-β-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), dopamina (DA, 3-hidroxitiramina ClH), 3-metoxitiramina (3-MT, 3-metoxi-4-hidroxifenetilamina), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA, ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético), α-metildopa (α-MD, 2-metil-3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina), N-metildopamina (NMD, deoxiepinefrina hidrocloreto), tiramina (Tir, 4-hidroxifenetilamina, tirosamina), L-noradrenalina bitartrato (NA), DL-normetanefrina (NMN), DL-3,4-dihidroxifenilacético (DHPG), 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), ácido vanililmandélico (VMA, ácido DL-4-hidroxi-3-metoximandélico), adrenalina bitartrato (A), DL-metanefrina (MN) y 3,4-dihidroxibencilamina (DHBA, usado como estándar interno) que, junto con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se compraron a Sigma Chemical Co.; ácido cítrico y dietilamina a Merck; ácido fórmico, ácido octano sulfónico y acetonitrilo a Scharlau. Los demás agentes y reactivos fueron de un alto grado de pureza y se usaron directamente, sin purificaciones posteriores. El agua fue destilada, desionizada y filtrada por filtros de 0,45 μm. de diámetro de poro.

### 2.3. Material.-

Este trabajo de investigación se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Series 4 de Perkin-Elmer unido a un detector electroquímico LC-4B de Bioanalytical Systems inc. equipado con una cubeta TL-5 de 2 μl de volumen de detección, la fase móvil fluye en el espacio que deja una pequeña plancha de plástico colocada entre dos bloques (fig. 12). El bloque inferior contiene un electrodo de trabajo de carbón vítreo embebido en Kel-F. La parte superior del bloque, que sirve como electrodo auxiliar, está fabricado de

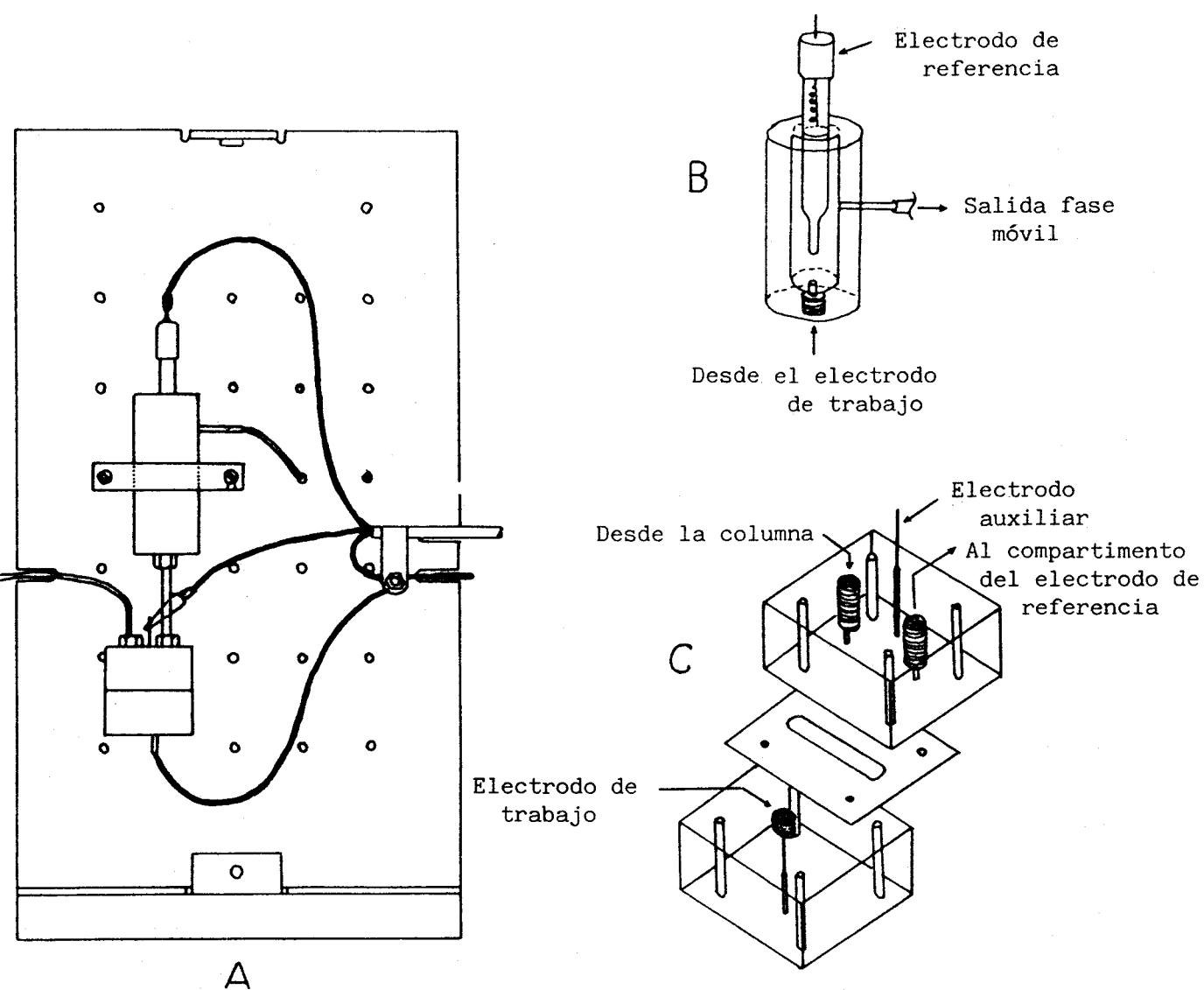


Figura 12. A: Dibujo del detector electroquímico con sus diferentes electrodos. B: Vista ampliada del electrodo de referencia metido en su compartimento. C: Detalles de la cubeta con los electrodos de trabajo y auxiliar.

acero inoxidable 316 que permite tener un bajo volumen muerto en las aberturas de entrada y salida. Como el electrodo auxiliar está opuesto directamente al de trabajo, la resistencia incompensada entre los dos es minimizada dando una mayor linealidad y una respuesta más rápida. El electrodo de referencia o contraelectrodo fue uno RE-1 de plata-cloruro de plata. Los análisis se registraron en una estación de datos Sigma 15 de Perkin-Elmer, con una velocidad de carta de 3 mm/min., atenuación 0, sensibilidad de área 70 y sensibilidad de línea base 30.

Las columnas fueron de fase reversa  $C_{18}$  de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula, pero de distintas longitudes: 8,3 cm. (cartuchos de Perkin-Elmer) ó 10 cm. de longitud (Spherisorb ODS-2 de Tracer-Analítica) y 0,46 cm. de diámetro interno (d.i.). Estaba protegida por una precolumna de Macherey-Nagel de 4,5 cm. de longitud, 0,46 cm. d.i. y 30-40  $\mu\text{m}$ . de diámetro de partícula, fácilmente recargable cada dos o tres meses.

Con objeto de minimizar los volúmenes muertos entre inyector, precolumna, columna y detector se unió el inyector a la columna por medio de un tubo metálico de 0,007" d.i. y se conectó la columna a la cubeta con un tubo de teflón de 10 cm. de longitud y 0.01" d.i.

El potencial del detector durante el análisis se mantuvo a +800 mV., oscilando el ruido de fondo entre 3,5 y 5,0 nA, dependiendo del grado de limpieza del detector. El análisis se realizó a temperatura ambiente (21-26°C) y de un modo isocrático, con un flujo de 0,8 ml/min., dando una presión entre 10,0 y 11,0 MPa (1450-1600 psi). La sensibilidad osciló entre 2 y 10 nA. El pH se ajustó a 3,10 con NaOH y la proporción de acetonitrilo osciló entre 4,5 y 5,0%.



#### 2.4. Preparación de los patrones. -

Las soluciones stock de aminas biógenas, derivados y estándar interno se prepararon mensualmente diluyéndolos en 0,1 M. de ácido perclórico y 0,2% (p/v) de bisulfito sódico, quedando todos a una concentración de 1 mg/ml. y se conservaron a -20°C, en alícuotas de 0,5 ml., excepto el DHPG y el MHPG, a +4°C, pues tienen una pérdida de respuesta cuando se comparan los patrones congelados con los refrigerados. Las soluciones de trabajo se prepararon semanalmente a partir de sus correspondientes soluciones stock, diluyéndolas con el fin de conseguir una concentración de 10 µg/ml. La mezcla de patrones se realizó cada dos días, teniendo cada uno de ellos una concentración de 1,5 ng/inyección, a excepción del triptófano, de 18 ng/inyección, por tener un potencial óptimo de oxidación de +850 mV., dando una menor respuesta a +800 mV. Esta mezcla se inyectó a intervalos regulares para determinar la sensibilidad del detector. Todas estas soluciones (de trabajo y mezcla de patrones) se almacenaron a +4°C en oscuridad. Un cromatograma de la mezcla de patrones puede verse en la figura 13.

La concentración de las aminas biógenas en el cerebro se calculó con la ayuda de curvas de calibración (lineales) obtenidas a partir de la inyección de la mezcla de patrones.

#### 2.5. Análisis de las muestras. -

##### 2.5.1. Determinación de aminas biógenas en el cerebro. -

Previo a su análisis, las muestras se sonicaron sobre hielo con 0,1 M. de ácido perclórico y 0,2% (p/v) de bisulfito sódico en un Labsonic 1510, en cinco veces, de 20 segundos cada una, a 50 vatios de potencia con descansos del

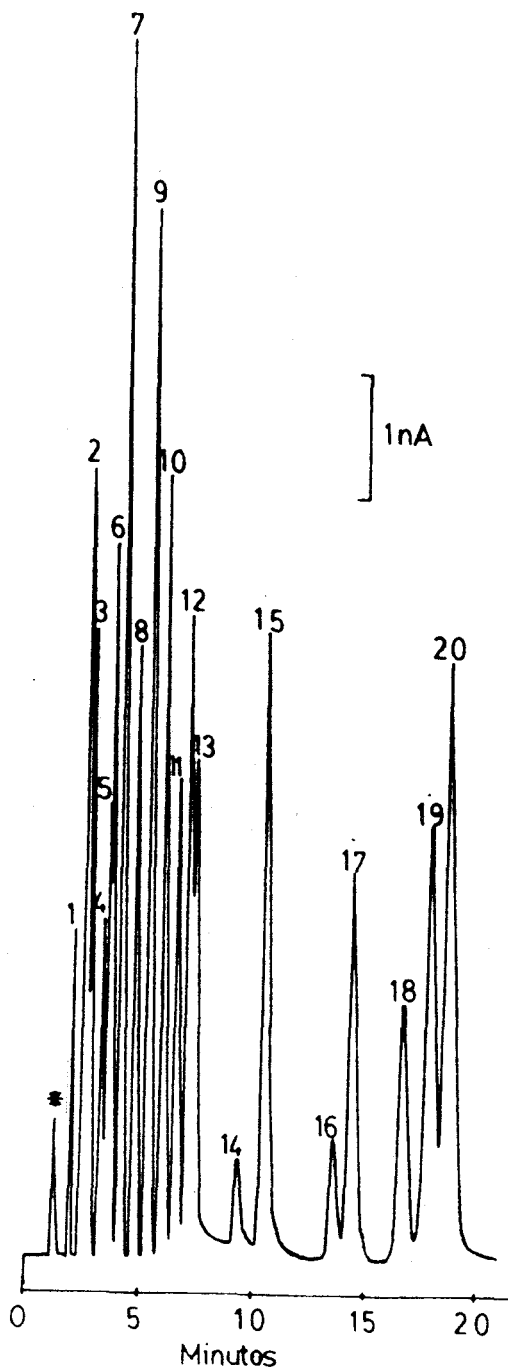


Figura 13. Cromatograma de una mezcla de patrones de aminas biógenas y metabolitos. 1. DHPG; 2. VMA; 3. NA; 4. MHPG; 5. A; 6.  $\alpha$ -MD; 7. DHBA; 8. NMN; 9. 5-HTP; 10. DA; 11. MN; 12. DOPAC; 13. NMD; 14. Tir; 15. 5-Htriptofol; 16. 5-HIAA; 17. 3-MT; 18. 5-HT; 19. Trip y 20. (HVA). \* pico de inyección. Se inyectaron 6  $\mu$ l que contenían 1,5 ng de cada patrón, excepto para el triptófano que contenía 18 ng. Ver material y métodos para conocer las condiciones cromatográficas del análisis y la nomenclatura.

doble tiempo de duración. Luego se centrifugaron a 30.000 x g durante 15 minutos en una centrífuga Kontron-Hermle Centrikon H-401. Más tarde, el sobrenadante se filtró por rotación a baja velocidad (1.000 x g) durante 5 minutos usando microfiltros NY-001 (Bioanalytical Systems inc.) de 0,2 µm. de diámetro de poro. Posteriormente, el ácido perclórico (pH= 1,0) se neutralizó antes del análisis para subir su pH hasta aproximadamente 3,0, añadiendo un 10% (v/v) del tampón de la fase móvil junto con NaOH 5N en una proporción 3:1 (v/v). Se inyectaron directamente en la columna de 6 a 20 µl de la muestra usando un inyector Rheodine 7125-075 con un bucle ('loop') de 6 ó 20 µl.

#### 2.5.2. Determinación de triptófano en sangre. -

Para la determinación del triptófano se obtuvieron muestras de sangre de entre 0,25 y 1,0 ml a cuatro animales de cada una de las siguientes edades: 0, 8, 15, 30 y 90 días. Éstas se recogieron en tubos Eppendorf que contenían 10 µl de heparina, se centrifugaron en una microcentrífuga Hettich durante cinco minutos y a una temperatura de +4°C. El plasma se conservó a -20°C hasta su uso. Previamente al análisis, el plasma se descongeló y se le añadió 22 µl de ácido perclórico 60% por cada mililitro de plasma para desproteinizar la muestra. Más tarde se volvió a centrifugar en la microcentrífuga durante quince minutos y a una temperatura de +4°C. El sobrenadante se filtró por rotación a baja velocidad (1000 x g) durante cinco minutos usando microfiltros de 0,2 µm de diámetro de poro.

## 2.6.- Estudio morfológico del geniculado lateral dorsal.-

### 2.6.1.- Perfusión y fijación.-

Todas las ratas fueron perfundidas intracardiamente, bajo anestesia con éter etílico, durante cinco minutos con suero salino 0,9% (+4°C), seguido inmediatamente por una perfusión de 50 a 150 ml de un fijador que contenía paraformaldehído 1%, glutaraldehído 1,5% y CaCl<sub>2</sub> 0,01% en buffer cacodilato sódico 0,1 M, a pH 7,2. A continuación se perfundía con un segundo fijador de paraformaldehído 2%, glutaraldehído 3% y CaCl<sub>2</sub> 0,01% en la misma solución tampón, en una cantidad de 200 a 250 ml (Karnowsky, 1965).

Los cerebros eran extraídos de sus cráneos y se sumergían en el segundo fijador.

### 2.6.2.- Localización e inclusión del geniculado lateral dorsal.-

Tras el periodo de fijación, el cerebro era lavado en buffer cacodilato sódico 0,1 M.

Se disecaba el trozo de cerebro comprendido entre el quiasma óptico y el colículo superior y se preparaba para ser cortado en un vibrotomo Lancer 1.000. En el vibrotomo se conseguían secciones coronales de 100 micras de espesor, a una tasa de vibración de 8-9 y a una velocidad de 2-4 unidades. Las secciones coronales era recogidas en buffer cacodilato sódico 0,1 M. Posteriormente, y con telelupa, se disecaba, de cada sección coronal cerebral, la zona del geniculado lateral dorsal con la ayuda de un microbisturí. Las secciones correspondientes al geniculado lateral dorsal se dejaban, numeradas según el eje antero-posterior, doce horas en buffer cacodilato sódico 0,1 M.

Dichas secciones se preparaban, a continuación, para microscopía: se sumergían en tetraóxido de osmio al 2% en buffer cacodilato sódico 0,1 M durante una hora; a continuación, se deshidrataban en series graduadas de alcohol y acetona; posteriormente se procedía a su inclusión en Epon 812.

### 2.6.3.- Microscopía electrónica. -

De las secciones de 100 micras incluidas en Epon se obtenían cortes de 600-800 Å en un ultramicrotomo LKB Bromma. Las secciones obtenidas se teñían con acetato de uranilo y citrato de plomo (Venable y Coggeshall, 1965) y se estudiaban en un microscopio electrónico, modelo Philips 301.

### 2.7. Puesta a punto de la técnica de medida por HPLC. -

#### 2.7.1. Condiciones eléctricas. -

El detector electroquímico es muy sensible a las fluctuaciones de la corriente eléctrica, nuestras medidas se mueven en un rango de 2 a 10 nA y es éste uno de los grandes inconvenientes con los que se enfrenta nuestro trabajo.

#### 2.7.2. Elección de las columnas. -

El tipo de relleno y las dimensiones de la columna son muy importantes para lograr unas óptimas condiciones cromatográficas. Nuestras primeras pruebas las realizamos con una columna de 12,5 cm de longitud y 5 µm de diámetro de partícula, los tiempos de retención eran demasiado grandes y el número de platos teóricos no era suficiente para nuestros objetivos. Por este motivo pasamos a utilizar columnas,

aunque más cortas (8,3 y 10 cm), pero con un relleno de partículas de diámetro menor (3  $\mu\text{m}$ ), disminuyendo el tiempo de retención de los últimos picos y la resolución es más perfecta (10.000-14.000 platos por columna), factor muy importante a tener en cuenta si se quieren cuantificar muchos productos y estar seguro de que no existen impurezas dentro de los picos estudiados.

### 2.7.3. Elección de la fase móvil.-

Nosotros buscamos entre diferentes fases móviles la más adecuada para nuestro trabajo. Como las reacciones electroquímicas necesitan un electrolito, las fases móviles típicas para HPLC contienen concentraciones de 0,05 a 0,10 M de los tampones acetato, citrato o fosfato. Las sales que contienen éstos y otros muchos tampones cristalizan al evaporarse el disolvente y, potencialmente, pueden dañar la bomba y el cierre del inyector. Por esto se aconseja lavar todo el sistema cuando no se va a usar, lo cual es un inconveniente por la pérdida de tiempo que supone, al requerir largos periodos para estabilizarse. Nuestra fase móvil posee 100 mM de ácido fórmico, éste es el mejor electrolito porque es volátil y porque proporciona capacidad tamponante en el pH óptimo ( $\text{pK} = 3,75$ ). Para aumentar esta capacidad tamponante se le añade 1 mM de ácido cítrico. El ácido octano sulfónico se utiliza como par iónico en una concentración óptima de 0,35 mM.

Los compuestos básicos, normalmente, producen grandes colas en las columnas de fase reversa debido a interacciones con grupos silanoles residuales, esto se elimina con la adición de 0,25% (v/v) de dietilamina. Por último, le añadimos 0,10 mM de EDTA para reducir las interferencias debidas al hierro o a metales similares (DiBussolo et al., 1983).

#### 2.7.4. Método de homogeneización del tejido cerebral. -

Debido a los pequeños volúmenes con que tenemos que trabajar (100-500  $\mu$ l), elegimos el sonicador como método para homogeneizar el tejido. Previamente, comprobamos que, cortando un cerebro en dos partes, homogeneizando una de ellas con el Potter y la otra con el ultrasonido, obteníamos los mismos resultados cuando las inyectábamos en el cromatógrafo.

Los volúmenes de homogeneización de los distintos centros eran generalmente de 1:10 (p/v), pero, a veces, hay que tener en cuenta la concentración de catecolaminas que existe en ese centro y su peso, para calcular el volumen de  $\text{ClO}_4\text{H}$  que le vamos a añadir. Se debe llegar a un compromiso entre diluir lo menos posible las catecolaminas y el obtener la cantidad suficiente de muestra para poder hacer varias inyecciones en el cromatógrafo.

#### 2.7.5. Elección del flujo. -

En la elección del flujo intervienen una serie de factores que debemos tener muy en cuenta: 1) La resolución de los distintos picos cambia según el flujo que elijamos; 2) el tiempo final no debe exceder de más de 30 minutos para evitar que la anchura en la base de los últimos picos sea demasiado grande; 3) los picos iniciales deben quedar perfectamente separados; 4) la razón señal/ruido (S/R) debe de ser lo más alta posible.

Según estudios realizados por DiBussolo et al. (1983), la resolución de los distintos picos es mejor a 1,0 ml/min que a 2,0 ml/min, además, las inyecciones de 50 picogramos de adrenalina con un potencial de +750 mV dieron una razón S/R de 5,0 a 1,0 ml/min, mientras que a 2,0 ml/min fue de 3,7. Para la adrenalina, el límite de detección (S/R=2) fue de 20

picoogramos a 1,0 ml/min y de 27 picoogramos a 2,0 ml/min. El ruido de pico a pico de 40 pA, no tuvo variación con el flujo y, de hecho, persistió cuando la bomba estaba parada.

Nosotros hemos elegido un flujo entre 0,8 y 1,0 ml/min, en el que el tiempo final no sobrepasa los 20 minutos y la resolución, tanto de los primeros picos como de los últimos, es bastante buena.

#### 2.7.6. Comprobación de la identidad de los picos. -

El voltagrama se utiliza para confirmar la identidad de los distintos compuestos. Hicimos varias inyecciones a distintos potenciales de oxidación tanto de la mezcla de patrones como de extractos de tejido y viendo el comportamiento electroquímico de cada compuesto, en los patrones como en el extracto, se estableció una similitud entre ellos, comprobando la especificidad de los ensayos.



### 3. RESULTADOS. -

#### 3.1. Determinación de triptófano en sangre. -

Como se puede observar en la tabla 1, la concentración de triptófano en sangre se mantiene en unos niveles superiores a los 10.000 ng/ml de sangre durante los primeros días, después del nacimiento de la rata. En el día 15 sufre una bajada estadísticamente significativa (50,0%,  $P < 0,001$ ) y, luego se produce una subida significativa a los 30 días (25,6%,  $P < 0,01$ ) y a los 90 días vuelve a tener unos niveles muy similares a los del día 15.

<u>Edad en días</u>	<u>Triptófano (ng/ml de sangre)</u>
0	11646,4 ± 679,8 (4)
8	10648,5 ± 605,8 (4)
15	5326,1 ± 247,8 (4)****
30	6690,2 ± 111,4 (4)**
90	5774,0 ± 586,1 (4)

Tabla 1.- Estudio de la concentración del triptófano en sangre. Cada valor, expresado en ng/ml de sangre, indica la media ± el error estándar de un cierto número de animales que está expresado entre paréntesis. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el valor anterior (test t de Student).

### 3.2. Vía visual. -

#### 3.2.1. Desarrollo. -

##### 3.2.1.1. Geniculado lateral. -

En la tabla 2 se muestra la concentración de 5-HT y sus metabolitos en el geniculado lateral. El triptófano tiene una disminución estadísticamente significativa a los 8 (40,5%,  $P < 0,01$ ), 15 (31,2%,  $P < 0,05$ ) y 30 días (51,5%,  $P < 0,001$ ), teniendo un ligero aumento a los 90 días. El 5-HTP no ha sido detectado en ninguno de los estadios estudiados.

En la 5-HT, al contrario que en el triptófano, se aprecia una subida significativa a los 8 (214,4%,  $P < 0,001$ ) y una bajada a los 15 días (21,2%,  $P < 0,05$ ), manteniéndose sin cambios significativos en el resto del desarrollo (tabla 2).

Esta indolamina es principalmente metabolizada a 5-HIAA por medio de la enzima monoamino oxidasa (MAO-A). Los niveles de 5-HIAA en estas estructuras puede ser indicativo del uso de la vía de 5-HT y hay que hacer resaltar que la 5-HT y el 5-HIAA tienen un desarrollo similar. Sin embargo, en el recién nacido, los niveles del 5-HIAA son mayores que los del 5-HT y la razón 5-HIAA/5-HT es mayor en la primera edad estudiada, especialmente en el geniculado lateral donde sólo a los 8 días es menor que la unidad.

El 5-HIAA tiene una subida durante todo el desarrollo, siendo estadísticamente significativa a los 15 (44,2%,  $P < 0,05$ ) y 90 días (34,4%,  $P < 0,05$ ).

El 5-Htriptofol, producido por la vía secundaria de degradación de 5-HT por la reducción del 5-hidroxiindolacetaldehído por la enzima alcohol reductasa (Cheifetz y Warsh, 1980), experimenta una marcada bajada a los 8 días (53,8%,  $P < 0,01$ ), pero en las demás edades

Edad en días	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
0	8676,2 ± 227,9 (4)	N. D.	141,1 ± 11,8 (6)	253,2 ± 14,8 (6)	13,2 ± 1,5 (5)
8	5162,8 ± 537,1 (4)**	N. D.	443,6 ± 19,1 (5)***	326,5 ± 32,6 (5)	6,1 ± 0,4 (4)**
15	3553,7 ± 129,4 (4)*	N. D.	349,4 ± 13,4 (4)*	470,7 ± 24,1 (4)*	11,3 ± 1,2 (4)*
30	1722,5 ± 155,5 (6)***	N. D.	355,2 ± 28,2 (5)	504,6 ± 45,8 (4)	17,3 ± 2,1 (4)
90	2018,3 ± 124,3 (4)	N. D.	445,9 ± 20,4 (4)	678,4 ± 31,2 (4)*	16,8 ± 1,8 (4)

Tabla 2.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos en el geniculado lateral durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D. = no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

estudiadas se mantiene dentro de unas concentraciones muy similares (tabla 2).

Esta estructura visual presenta las mayores concentraciones de NA, próximas a los 100 ng/g de tejido húmedo, a los 0, 8 y 15 días y con una subida significativa a los 30 (76,7%,  $P < 0,001$ ) y 90 días (20,6%,  $P < 0,05$ ) (tabla 3).

Su principal metabolito en el cerebro, el MHPG, también posee los más altos niveles de todos los estudiados a los 8 y 15 días, aunque no ha sido detectado en el recién nacido. Sufre una subida significativa a los 15 días (21,0%,  $P < 0,01$ ) (tabla 3) y un ligero aumento en los siguientes estadios, por lo que alcanza su nivel adulto bastante temprano (15 días).

La NMN tiene el mismo comportamiento de los dos últimos componentes, su concentración es la más alta de todas las encontradas en las diferentes áreas visuales durante todo el desarrollo, con aumentos estadísticamente significativos a los 15 (112,4%,  $P < 0,01$ ) y 30 días (47,6%,  $P < 0,01$ ), no habiendo cambios en el final de este periodo (tabla 3).

La DA y sus metabolitos se caracterizan en la vía visual durante el desarrollo por sus escasas variaciones. En el geniculado lateral la DA sufre una subida significativa a los 8 (43,2%,  $P < 0,05$ ) y 15 días (44,2%,  $P < 0,05$ ) y a partir de esta edad permanece sin cambios destacables (tabla 4).

El 3-MT sufre un ligero aumento durante todo este periodo que sólo es significativo a los 90 días (60,5%,  $P < 0,05$ ) y su coeficiente de correlación es:  $r = 0,964$ .

El DOPAC alcanza sus niveles adultos muy tempranamente, en el recién nacido ya casi tiene la misma concentración que a los 90 días, por lo que aunque su concentración es mayor que la de la DA al principio, luego, a partir de los 15 días, la de esta última sobrepasa a la del primero.

Edad en días	NA	MHPG	NMN
0	83,7 ± 8,3 (7)	N.D.	15,9 ± 1,8 (4)
8	97,1 ± 9,6 (5)	54,7 ± 1,1 (4)	17,7 ± 4,1 (4)
15	121,1 ± 5,1 (5)	66,2 ± 1,4 (4)**	37,6 ± 2,1 (5)**
30	214,0 ± 10,6 (6)***	83,1 ± 8,8 (4)	55,5 ± 3,8 (4)**
90	258,1 ± 14,0 (7)*	104,3 ± 6,9 (4)	59,7 ± 3,2 (4)

Tabla 3.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos en el geniculado lateral dorsal durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D. = no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en días	DA	3-MT	DOPAC	HVA
0	32,4 ± 2,3 (6)	15,8 ± 3,2 (4)	46,8 ± 2,2 (7)	70,8 ± 4,6 (7)
8	46,4 ± 5,4 (5)*	20,1 ± 3,6 (4)	50,6 ± 4,7 (4)	76,6 ± 5,9 (4)
15	66,9 ± 4,0 (4)*	25,9 ± 2,9 (4)	56,3 ± 3,8 (4)	90,0 ± 9,3 (5)
30	60,7 ± 4,7 (5)	24,8 ± 3,4 (6)	58,6 ± 6,7 (6)	112,2 ± 11,1 (6)
90	62,4 ± 3,8 (4)	39,8 ± 3,7 (4)*	52,4 ± 3,8 (4)	76,5 ± 5,2 (5)*

Tabla 4.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos en el geniculado lateral dorsal durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

El HVA posee en esta estructura los niveles más altos de estos compuestos y sufre una ligera subida hasta los 30 días, momento en el que se produce una bajada significativa (31,8%,  $P < 0,05$ ) (tabla 4).

### 3.2.1.2. Corteza visual. -

La curva de desarrollo del triptófano es muy similar a la del geniculado lateral, con una disminución significativa a los 8 (63,6%,  $P < 0,001$ ) y 15 días (35,3%,  $P < 0,001$ ). El 5-HTP no ha sido detectado en este periodo (tabla 5).

La corteza visual es la estructura con los más bajos niveles de 5-HT a los 0 días, alcanzando su nivel adulto a los ocho días, en el que se produce un aumento significativo de su concentración (250,4%,  $P < 0,001$ ), más tarde hay una bajada a los 15 días (33,6%,  $P < 0,001$ ), seguida de otra subida a los 30 (18,8%,  $P < 0,05$ ) y 90 días (18,9%,  $P < 0,05$ ), volviendo a tener una cantidad de 5-HT muy semejante a la de los 8 días, que es aproximadamente tres veces mayor, que la encontrada en el recién nacido (tabla 5).

En el 5-HIAA, lo mismo que en el geniculado lateral, se aprecian subidas en todos los estadios, siendo significativas a los 8 (48,4%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (70,8%,  $P < 0,05$ ).

El 5-Htriptofol tiene una fuerte subida a los 8 días (49,7%,  $P < 0,01$ ), luego una bajada a los 15 días (57,1%,  $P < 0,001$ ) y su concentración se mantiene alrededor de 11 ng/g de tejido húmedo en el resto de las edades estudiadas (tabla 5).

El geniculado lateral posee la más altas concentraciones de NA y sus metabolitos y, la corteza visual, las más bajas. Esta catecolamina sufre una subida significativa ( $r=0,960$ ) a los 15 (62,2%,  $P < 0,001$ ), 30 (90,6%,  $P < 0,001$ ) y 90 días

Edad en días	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
0	8705,3 ± 383,2 (5)	N. D.	75,6 ± 3,5 (6)	90,1 ± 5,1 (6)	15,9 ± 0,8 (4)
8	3165,3 ± 143,0 (5)****	N. D.	264,9 ± 12,8 (5)****	133,7 ± 7,2 (5)***	23,8 ± 1,6 (4)**
15	2047,9 ± 66,9 (6)****	N. D.	176,0 ± 7,6 (6)****	143,0 ± 7,2 (6)	10,2 ± 1,4 (6)****
30	1940,3 ± 184,4 (4)	N. D.	209,1 ± 10,8 (4)*	149,6 ± 19,4 (4)	11,0 ± 1,4 (4)
90	2127,9 ± 111,2 (4)	N. D.	248,7 ± 8,2 (4)*	255,6 ± 25,9 (4)*	12,4 ± 1,4 (4)

Tabla 5.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos en la corteza visual durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).



Edad en días	NA	MHPG	NMN
0	36,2 ± 3,5 (7)	N. D.	N. D.
8	40,7 ± 1,5 (6)	26,4 ± 1,3 (4)	3,1 ± 0,4 (4)
15	66,0 ± 4,8 (6)****	49,4 ± 4,0 (4)**	14,0 ± 0,6 (5)****
30	125,8 ± 5,0 (5)****	52,3 ± 4,7 (4)	23,5 ± 2,1 (4)**
90	190,1 ± 9,3 (6)****	65,5 ± 3,0 (4)	42,5 ± 2,5 (4)**

Tabla 6.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos en la corteza visual durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

(51,1%,  $P < 0,001$ ), aunque al principio del desarrollo se mantiene en unos niveles similares (tabla 6).

EL MHPG, como en el geniculado lateral, no ha sido detectado en el recién nacido y sólo se produce un aumento estadísticamente significativo a los 15 días (87,1%,  $P < 0,01$ ), alcanzando a esta edad su nivel adulto.

La NMN tiene subidas significativas a los 15 (351,6%,  $P < 0,001$ ), 30 (67,9%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (80,8%,  $P < 0,01$ ) (tabla 6).

Lo mismo que con las otras aminas biógenas, la corteza visual tiene las más bajas concentraciones de DA. Esta catecolamina alcanza su nivel adulto a los 8 días, en los que experimenta un aumento significativo (86,5%,  $P < 0,05$ ).

El 3-MT sufre una ligera disminución a través de todo este periodo (tabla 7). El DOPAC, al igual que la DA, tiene una subida estadísticamente significativa a los 8 días (28,6%,  $P < 0,01$ ) y a partir de este estadio no se aprecian cambios destacables.

El comportamiento del HVA es muy parecido al del 3-MT, con una ligera disminución que sólo es significativa a los 8 días (61,4%,  $P < 0,001$ ) (tabla 7).

### 3.2.1.3. Colículo superior. -

La concentración de triptófano en el colículo superior es la menor de todas las encontradas en las cuatro estructuras visuales en el recién nacido, con una disminución hasta el día 30, la cual es significativa a los 8 (43,8%,  $P < 0,001$ ) y 15 días (58,1%,  $P < 0,001$ ) y un aumento al final del desarrollo (45,4%,  $P < 0,01$ ). Por el contrario, el 5-HTP tiene una subida que es significativa a los 8 (577,8%,  $P < 0,05$ ) y 30 días (132,4%,  $P < 0,01$ ), estabilizandose a partir de esta edad (tabla 8).

Edad en días	DA	3-MT	DOPAC	HVA
0	11,1 ± 1,3 (6)	17,8 ± 1,6 (4)	23,1 ± 1,0 (6)	75,4 ± 2,5 (4)
8	20,7 ± 2,7 (5)*	15,3 ± 1,4 (4)	29,7 ± 1,4 (6)**	29,1 ± 1,3 (5)***
15	24,0 ± 1,9 (8)	14,5 ± 1,5 (5)	32,5 ± 2,6 (5)	29,6 ± 1,3 (8)
30	20,7 ± 1,8 (4)	10,6 ± 1,1 (4)	36,4 ± 1,5 (5)	27,0 ± 4,4 (5)
90	28,0 ± 4,0 (5)	12,7 1,3 (4)	35,7 ± 2,5 (5)	22,3 ± 3,2 (4)

Tabla 7.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos en la corteza visual durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en días	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
0	6395,2 ± 203,3 (5)	0,9 ± 1,0 (4)	167,6 ± 5,3 (6)	342,0 ± 15,7 (5)	8,9 ± 0,6 (5)
8	3591,8 ± 271,5 (5)****	6,1 ± 1,4 (4)*	407,0 ± 16,1 (5)****	490,3 ± 41,3 (4)*	13,1 ± 1,4 (4)*
15	1506,1 ± 91,0 (5)****	7,1 ± 1,1 (5)	449,3 ± 19,8 (4)	483,4 ± 29,9 (6)	13,8 ± 0,9 (4)
30	1421,2 ± 120,4 (4)	16,5 ± 1,7 (4)**	492,0 ± 23,1 (4)	480,5 ± 24,4 (4)	12,9 ± 1,0 (4)
90	2065,9 ± 42,5 (4)***	14,3 ± 0,7 (4)	643,8 ± 13,3 (4)***	463,5 ± 18,3 (4)	14,8 ± 2,9 (4)

Tabla 8.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos en el colículo superior durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

El colículo superior presenta niveles de 5-HT similares al geniculado lateral en el recién nacido y con semejante perfil de desarrollo. Sufre una subida estadísticamente significativa a los 8 (142,8%,  $P < 0,001$ ) y 90 días (30,8%,  $P < 0,01$ ), pero se mantiene en concentraciones muy similares entre los 8 y 30 días (tabla 8).

El 5-HIAA experimenta una subida significativa a los 8 días (43,4%,  $P < 0,05$ ) alcanzando a esta edad su nivel adulto (tabla 8).

El 5-Htriptofol tiene el mismo comportamiento que el 5-HIAA, con una subida a los 8 días (47,2%,  $P < 0,05$ ), manteniéndose, a partir de esta edad, sin diferencias significativas.

La NA sube durante todos los estadios del desarrollo con un coeficiente de correlación  $r=0,945$ . Este aumento es significativo a los 8 (28,2%,  $P < 0,01$ ), 15 (263,2%,  $P < 0,001$ ), 30 (49,9%,  $P < 0,001$ ) y 90 días (60,7%,  $P < 0,01$ ) (tabla 9).

El MHPG no ha sido detectado en el recién nacido y presenta cantidades muy pequeñas al principio del desarrollo, pero a los 30 días se produce una marcada subida (284,9%,  $P < 0,001$ ), estabilizándose su concentración al final de este periodo.

La NMN no ha sido detectada a los cero días, teniendo un perfil de desarrollo muy parecido a la NA ( $r=0,977$ ), con fuertes subidas a los 15 (83,3%,  $P < 0,01$ ), 30 (95,0%,  $P < 0,001$ ) y 90 días (86,9%,  $P < 0,001$ ) y con niveles muy similares a los de la corteza visual (tabla 9).

Este área visual posee los más bajos niveles de DA en el recién nacido, con aumentos significativos a los 8 (203,2%,  $P < 0,001$ ), 15 (84,6%,  $P < 0,001$ ), 30 (42,4%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (76,5%,  $P < 0,001$ ), llegando a alcanzar en esta última edad los más altos niveles de esta catecolamina (tabla 10).

El 3-MT presenta muy bajos niveles (por debajo de 7,0 ng/g de tejido húmedo hasta el día 30), con subidas

Edad en días	NA	MHPG	NMN
0	25,2 ± 0,6 (6)	N. D.	N. D.
8	32,3 ± 1,4 (6)**	16,0 ± 0,7 (4)	6,6 ± 0,6 (4)
15	117,3 ± 4,9 (6)****	10,6 ± 1,1 (4)*	12,1 ± 0,7 (5)**
30	175,8 ± 10,1 (5)****	40,8 ± 0,8 (4)****	23,6 ± 1,4 (5)****
90	282,6 ± 16,4 (4)**	54,5 ± 6,0 (4)	44,1 ± 2,8 (4)****

Tabla 9.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos en el colículo superior durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en días	DA	3-MT	DOPAC	HVA
0	6,2 ± 0,6 (4)	3,1 ± 0,4 (4)	17,9 ± 0,8 (5)	25,3 ± 0,8 (7)
8	18,8 ± 1,5 (4)****	3,3 ± 0,2 (4)	24,0 ± 1,0 (4)***	37,2 ± 1,0 (5)****
15	34,7 ± 1,0 (4)****	6,0 ± 0,7 (4)*	23,0 ± 0,5 (4)	25,6 ± 1,4 (6)****
30	49,4 ± 2,3 (4)**	7,0 ± 0,7 (4)	26,6 ± 1,5 (4)	32,4 ± 4,4 (4)
90	87,2 ± 3,9 (6)****	13,4 ± 1,2 (4)**	21,8 ± 0,5 (4)*	21,6 ± 2,3 (4)

Tabla 10.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos en el colículo superior durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

significativas a los 15 (81,8%,  $P < 0,05$ ) y 90 días (91,4%,  $P < 0,01$ ) y un alto coeficiente de correlación muy similar al de la DA ( $r = 0,986$  y  $0,970$ , respectivamente).

La concentración del DOPAC sube a los 8 días (34,1%,  $P < 0,01$ ) y se mantiene en unos niveles muy similares (25,0 ng/g tejido húmedo) durante todo el resto del desarrollo, teniendo una ligera bajada a los 90 días (18,0%,  $P < 0,05$ ) (tabla 10).

El HVA se comporta muy irregularmente en este periodo, comienza con una subida significativa a los 8 días (47,0%,  $P < 0,001$ ), una bajada a los 15 días (31,2%,  $P < 0,001$ ) y se mantiene estable en los estadios siguientes (tabla 10).

#### 3.2.1.4. Tálamo posterior.

Lo mismo que en las anteriores áreas cerebrales, la concentración de triptófano en el tálamo posterior es la más alta de todas las estudiadas, aunque fue el único componente con una disminución hasta el día 30 y luego con una subida en la última edad estudiada. En el tálamo posterior, su concentración en el recién nacido es la más alta de todas las estudiadas, teniendo una bajada significativa a los 8 (73,2%,  $P < 0,001$ ) y 15 días (24,8%,  $P < 0,01$ ) y una subida a los 90 días (39,4%,  $P < 0,01$ ). El 5-HTP tiene una ligera subida que, en ningún caso, es significativa (tabla 11).

Esta estructura visual posee la más alta concentración de 5-HT en el recién nacido y su nivel a los 90 días es muy parecido al del colículo superior en esta misma edad. Esta indolamina sufre una ligera disminución hasta el día 15 y luego una subida significativa a los 30 (84,9%,  $P < 0,001$ ) y 90 días (79,7%,  $P < 0,001$ ) (tabla 11).

El 5-HIAA experimenta un aumento estadísticamente significativo a los 8 (37,4%,  $P < 0,01$ ) y 15 días (19,1%,



Edad en días	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
0	10616,9 ± 576,0 (6)	5,0 ± 0,6 (4)	238,4 ± 9,0 (6)	294,3 ± 18,8 (6)	6,1 ± 2,2 (4)
8	2838,1 ± 101,1 (5)***	4,8 ± 0,7 (4)	225,4 ± 9,5 (5)	404,4 ± 15,9 (5)***	6,5 ± 1,5 (4)
15	2133,2 ± 82,9 (4)**	6,5 ± 0,9 (4)	194,0 ± 5,9 (4)	481,5 ± 22,5 (4)*	10,6 ± 0,7 (4)
30	1774,3 ± 120,6 (6)	7,8 ± 2,6 (4)	358,7 ± 16,0 (6)****	485,1 ± 24,5 (6)	14,8 ± 1,8 (4)
90	2473,3 ± 93,2 (4)**	11,2 ± 1,3 (4)	644,7 ± 26,8 (4)****	627,9 ± 27,3 (4)**	17,6 ± 1,9 (4)

Tabla 11.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos en el tálamo posterior durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

P<0,05), estabilizándose a los 30 días y subiendo significativamente a los 90 días (29,4%, P<0,01) (tabla 11).

El 5-Htriptofol, lo mismo que el 5-HTP, tiene una ligera subida durante todo el desarrollo.

El comportamiento de la NA es muy parecido en el tálamo posterior y en el colículo superior ( $r=0,359$ ), tiene subidas significativas a los 15 (206,4%, P<0,001) y 30 días (162,4%, P<0,001) (tabla 12), pero su concentración se estabiliza a partir de esta última edad y, además, es ligeramente inferior a la que posee el colículo superior (tabla 9) cuando se comparan éstas a las mismas edades, excepto a los 30 días.

El MHPG no ha sido detectado en el recién nacido, teniendo una fuerte subida a los 15 (113,1%, P<0,001) y 30 días (182,9%, P<0,001) y se mantiene estable a los 90 días.

La NMN se mantiene en unos bajos niveles hasta los 30 días, momento en el que se produce una subida estadísticamente significativa (201,6%, P<0,001) y, como la NA y el MHPG, no sufre cambios significativos hasta el final del desarrollo (tabla 12).

En la DA se aprecia una ligera subida durante el desarrollo, con un coeficiente de correlación  $r=0,844$ , pero sólo es significativa a los 90 días (30,8%, P<0,05) (tabla 13).

El 3-MT posee una curva de desarrollo muy similar a la de la DA, con un mayor coeficiente de correlación  $r=0,994$  y un aumento significativo a los 90 días (58,7%, P<0,05).

El comportamiento del DOPAC en el tálamo posterior es parecido al del colículo superior (tabla 10), con un aumento significativo a los 8 días (17,7%, P<0,05), una estabilización a los 15 y 30 días y una bajada a los 90 días (41,0%, P<0,01).

Lo más destacable del HVA es su marcada subida a los 8 días (1440,0%, P<0,001) junto con una bajada

Edad en días	NA	MHPG	NMN
0	30,1 ± 0,9 (6)	N. D.	7,7 ± 1,0 (4)
8	28,3 ± 1,4 (6)	24,4 ± 2,1 (4)	9,8 ± 1,8 (4)
15	86,7 ± 4,3 (5)***	52,0 ± 1,0 (4)***	18,4 ± 1,4 (4)*
30	227,5 ± 8,3 (8)***	147,1 ± 12,9 (4)***	55,5 ± 2,9 (5)***
90	259,3 ± 11,8 (7)	143,0 ± 7,6 (4)	54,5 ± 7,9 (4)

Tabla 12.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos en el tálamo posterior durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en días	DA	3-MT	DOPAC	HVA.
0	26,2 ± 3,7 (4)	12,9 ± 0,2 (4)	56,4 ± 1,6 (5)	9,0 ± 0,5 (6)
8	36,9 ± 4,0 (5)	13,7 ± 0,9 (4)	66,4 ± 3,4 (5)*	138,6 ± 4,4 (5)***
15	45,5 ± 4,2 (4)	14,3 ± 1,1 (4)	61,0 ± 1,7 (4)	44,3 ± 3,3 (5)**
30	41,6 ± 2,2 (9)	19,6 ± 2,5 (5)	64,1 ± 3,9 (6)	55,0 ± 3,7 (8)
90	54,4 ± 4,4 (4)*	31,1 ± 3,0 (4)*	37,8 ± 4,3 (4)***	63,1 ± 7,5 (5)

Tabla 13.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos en el tálamo posterior durante el desarrollo. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

estadísticamente significativa a los 15 días (68,0%,  $P < 0,01$ ) y una ligera subida a los 30 y 90 días (tabla 13).

### 3.2.2. Bienucleación. -

#### 3.2.2.1. - Geniculado lateral. -

En la figura 14 podemos observar la concentración de triptófano en el geniculado lateral dorsal comparando el control con el correspondiente enucleado. En todas las edades estudiadas no existen cambios significativos de la concentración del enucleado, con un rango entre 3500 y 4600ng/g de tejido húmedo. A partir de los 15 días sus niveles se mantienen siempre por encima de los del control, siendo estadísticamente significativos a los 15 (29,6%,  $P < 0,01$ ), 30 (145,9%,  $P < 0,01$ ), 90 (76,3%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (42,9%,  $P < 0,01$ ).

Al igual que en el control, el 5-HTP no ha sido detectado en el geniculado lateral del enucleado durante todos los estadios estudiados.

La serotonina, en el geniculado lateral, aumenta en todas las edades estudiadas, siendo significativo a los 30 (45,8%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (45,3%,  $P < 0,01$ ). Con respecto al normal, la concentración del enucleado a los 8 (-33,0%,  $P < 0,01$ ) y 15 días (-12,3%) es menor que la del primero, a partir de los 30 días pasa a ser superior la del segundo, siendo significativa la diferencia a los 90 días (45,6%,  $P < 0,01$ ) y volviendo a igualarse a los 180 días (figura 15).

La concentración de 5-HIAA permanece estable entre los 8 y 15 días, teniendo a los 30 días una fuerte subida (168,2%,  $P < 0,001$ ) y a partir de esta edad no experimenta cambios significativos. El 5-HIAA tiene en esta estructura visual un comportamiento muy similar al 5-HT. En los dos primeros

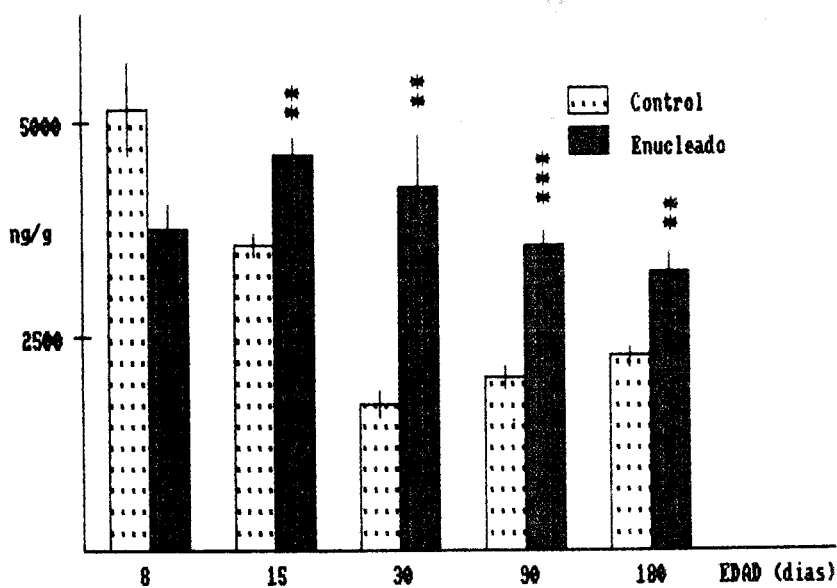


Figura 14: Concentración de triptófano en el geniculado lateral. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

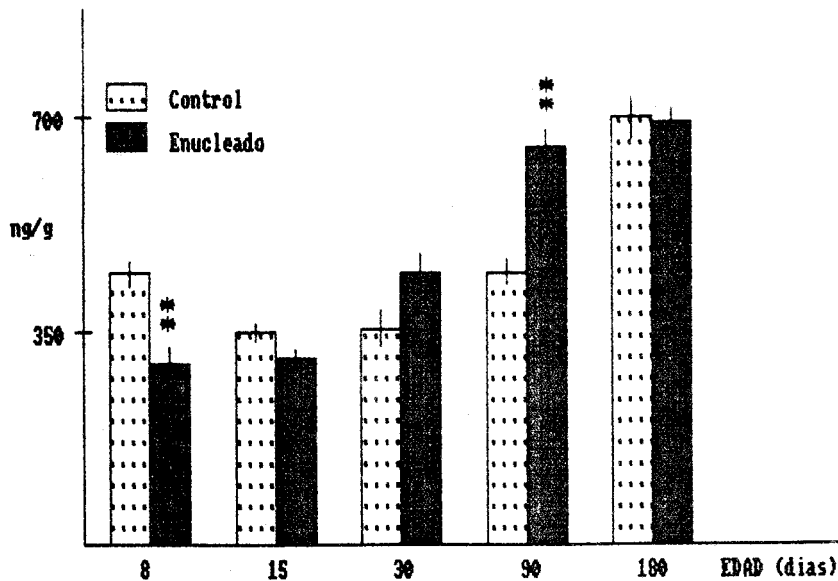


Figura 15: Concentración de serotonina en el geniculado lateral. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

estadios la concentración del control es superior a la del enucleado, siendo la diferencia significativa a los 15 días (-45,1%,  $P < 0,001$ ), pero a partir del día 30, la concentración del segundo es mayor que la del primero, con diferencias significativas a los 30 (37,4%,  $P < 0,05$ ) y 180 días (26,5%,  $P < 0,01$ ) (figura 16).

El 5-Htriptofol no sufre cambios significativos en su concentración en el enucleado durante todas las edades estudiadas y, excepto a los ocho días, su concentración siempre es inferior a la del control, teniendo en la última edad mencionada una diferencia significativa (93,4%,  $P < 0,01$ ) (figura 17).

La concentración de NA experimenta una marcada bajada a los 15 días (51,0%,  $P < 0,001$ ), pero luego tiene subidas estadísticamente significativas a los 30 (195,9%,  $P < 0,01$ ), 90 (28,6,  $P < 0,05$ ) y 180 días (92,0%,  $P < 0,001$ ). En los dos primeros estadios del desarrollo la concentración de NA tiene un comportamiento diferente al comparar el enucleado y el control, a los ocho días la concentración del primero es mayor (42,4%,  $P < 0,05$ ), mientras que, a los 15 días, concentración es menor (-44,0%,  $P < 0,001$ ) (figura 18). A los 30 y 90 días sus niveles son muy parecidos y a los 180 días, al subir el nivel del enucleado más que el del control, se produce una marcada diferencia (69,4%,  $P < 0,01$ ).

El MHPG no ha sido detectado a los 8 días, con aumentos significativos a los 30 (228,7%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (311,8%,  $P < 0,001$ ), manteniéndose sin cambios a los 180 días. Hasta los 30 días, la concentración del enucleado se mantiene muy por debajo de la del control, con diferencias significativas a los 15 (-87,9%,  $P < 0,001$ ) y 30 días (-68,3%,  $P < 0,01$ ) (figura 19). A los 3 y 6 meses sus concentraciones son muy parecidas.

La NMN sufre bajadas significativas a los 15 (44,4%,  $P < 0,05$ ) y 180 días (51,5,  $P < 0,01$ ) y sólo tiene una marcada

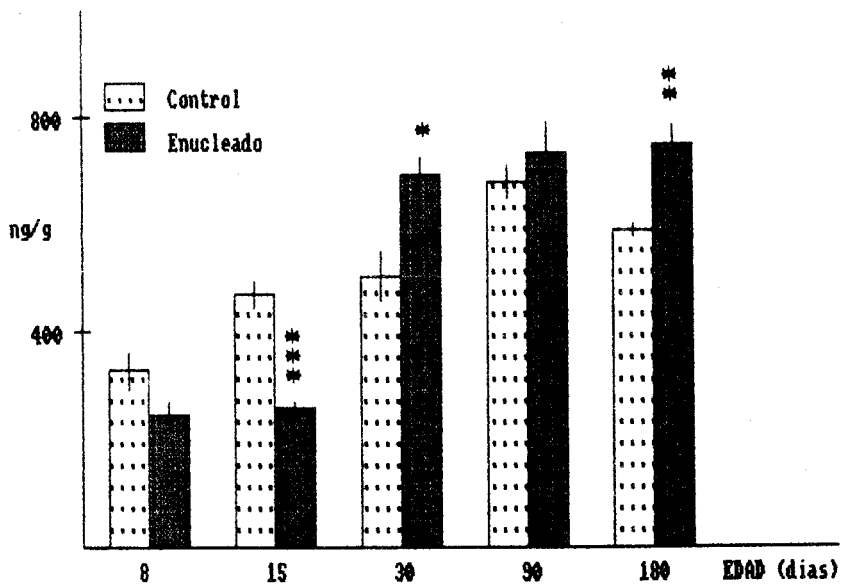


Figura 16: Concentración de ácido 5-hidroxiindolacético en el geniculado lateral. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

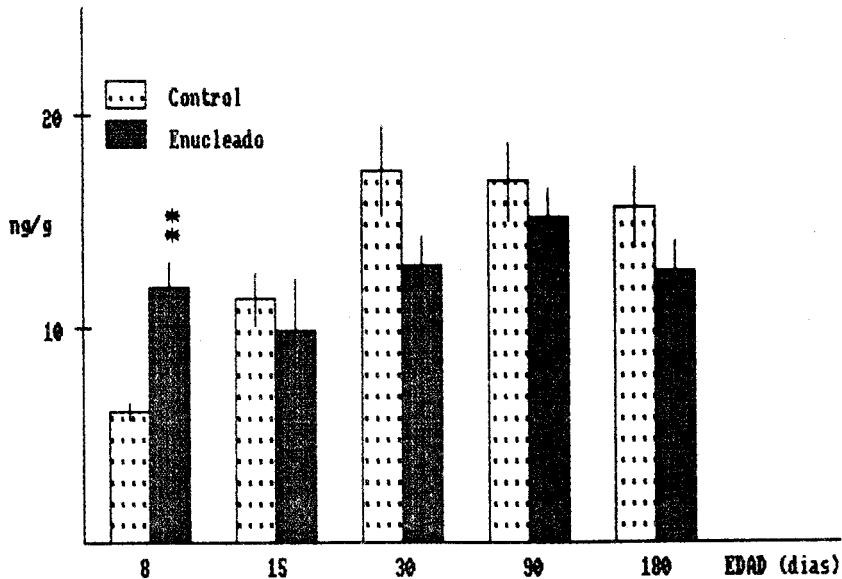


Figura 17: Concentración de 5-hidroxitriptofol en el geniculado lateral. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).



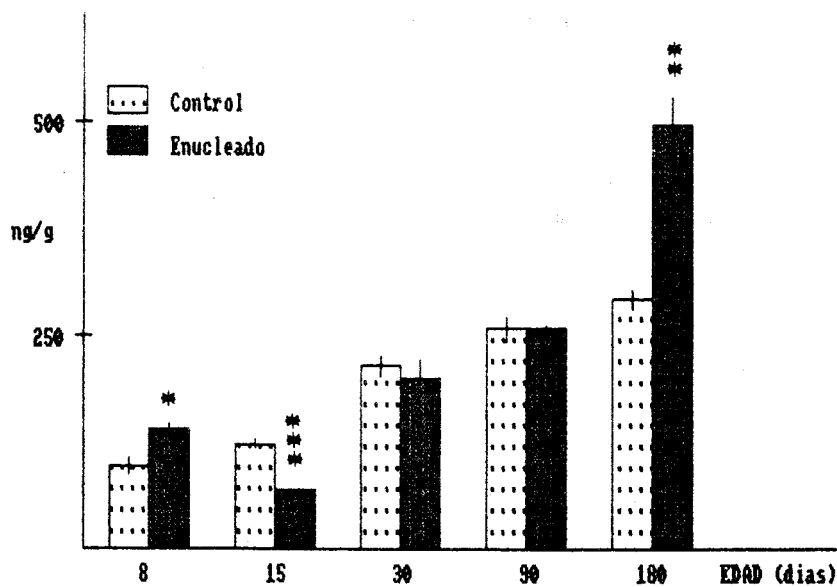


Figura 18: Concentración de noradrenalina en el geniculado lateral. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

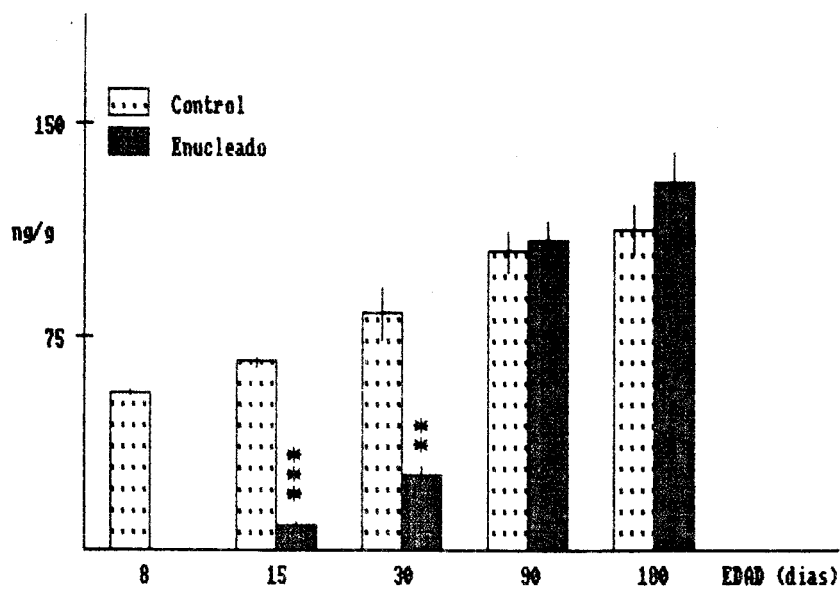


Figura 19: Concentración de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol en el geniculado lateral. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

subida a los 30 días (174,9%,  $P<0,001$ ). Al igual que sucede con la NA, el perfil de desarrollo del NMN durante los primeros días es diferente en enucleado y control, mientras a los 8 días la concentración del primero es mayor que la del segundo (78,0%), a los 15 días ocurre al contrario (-53,5%,  $P<0,001$ ). Esta última condición se mantiene en todos los demás estadios estudiados, siendo sólo significativa la diferencia a los 6 meses (-50,6%,  $P<0,001$ ) (figura 20).

La concentración de DA sufre una marcada disminución a los 15 días (52,2%,  $P<0,001$ ), con un aumento a los 30 días (82,1%,  $P<0,05$ ) y a partir de esta edad se mantiene estable. Al comparar los niveles del control con los del enucleado, sólo se observan diferencias en los dos primeros estadios del desarrollo, a los 8 (52,9%,  $P<0,05$ ) y 15 días (-49,2%,  $P<0,001$ ) (figura 21), siendo muy similares a los 30, 90 y 180 días, donde los niveles del enucleado son siempre un poco más altos.

El DOPAC tiene una subida hasta los 30 días, momento en que es significativa (35,6%,  $P<0,01$ ), luego una bajada a los 90 días (32,1%,  $P<0,01$ ) hasta alcanzar casi los niveles de los 8 días, para más tarde, tener una marcada subida a los 180 días (92,3%,  $P<0,001$ ) con la que supera la concentración de los 30 días. Con respecto al control, únicamente existen diferencias significativas a los 6 meses (128,5%,  $P<0,001$ ) (figura 22).

El HVA sufre una bajada significativa a los 15 días (40,3%,  $P<0,05$ ), no teniendo cambios apreciables en las demás edades estudiadas. Viendo los datos del control, no se observan diferencias significativas con los del enucleado (figura 23).

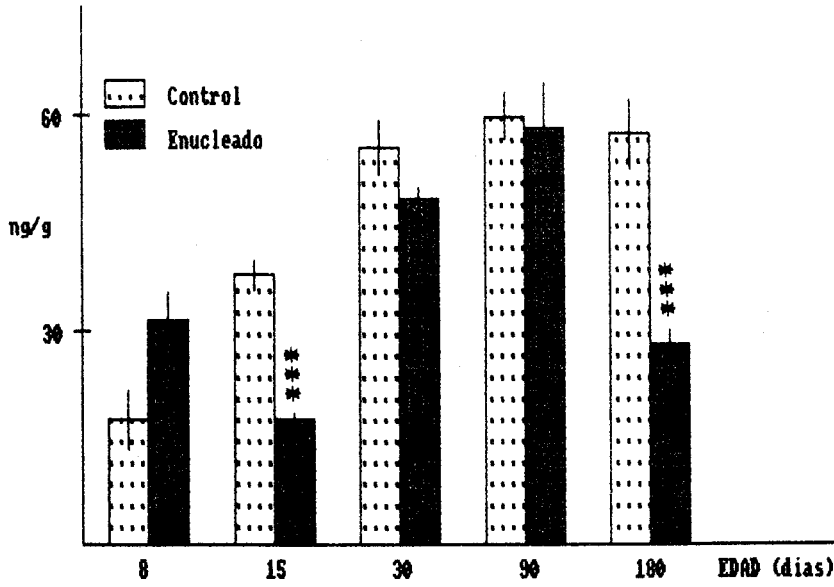


Figura 20: Concentración de normetanefrina en el geniculado lateral. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

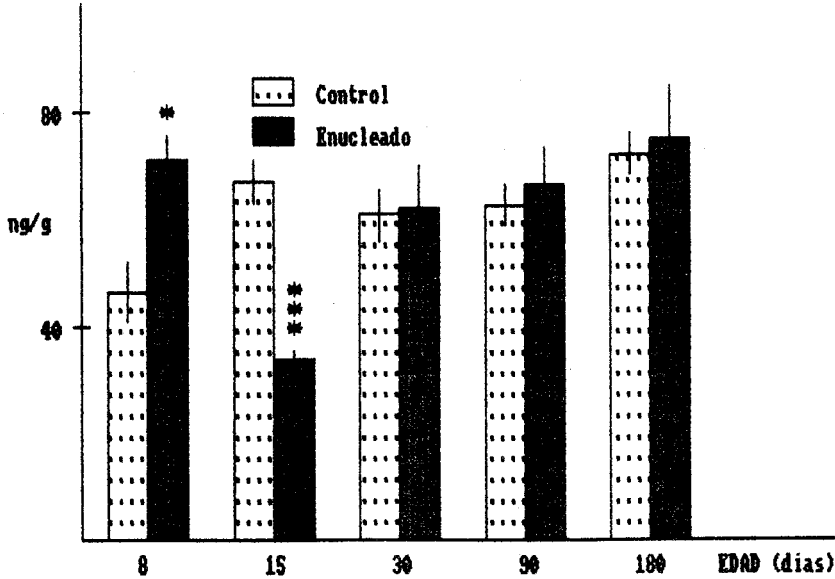


Figura 21: Concentración de dopamina en el geniculado lateral. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

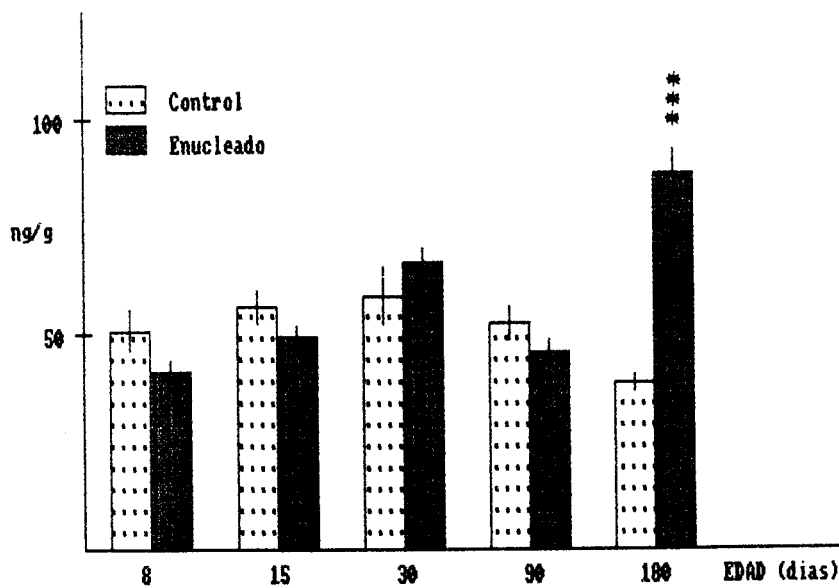


Figura 22: Concentración de DOPAC en el geniculado lateral. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

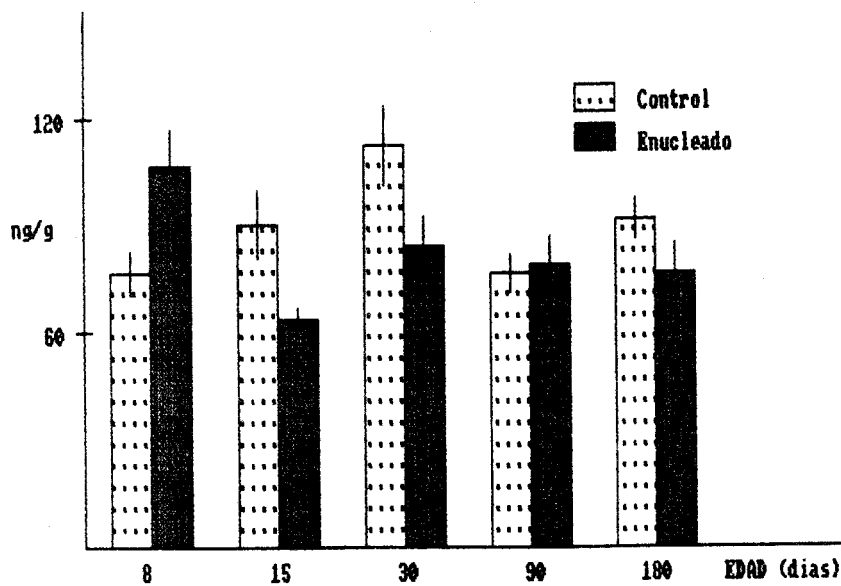


Figura 23: Concentración de ácido homovanílico en el geniculado lateral. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

### 3.2.2.2. Corteza visual. -

En la concentración de triptófano de la corteza visual, como en la del geniculado lateral, tampoco se aprecian cambios significativos en el enucleado, con un rango entre 2.700 y 3.500 ng/g de tejido húmedo. Al comparar el triptófano de enucleado con el del control, excepto a los 8 días, sus niveles se mantienen siempre por encima, con diferencias significativas a los 15 (58,6%,  $P < 0,01$ ), 30 (48,5%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (44,8%,  $P < 0,001$ ) (figura 24). La concentración de 5-HTP no ha sido detectado durante todas las edades estudiadas.

La 5-HT alcanza en el enucleado el nivel adulto muy temprano (8 días) y, excepto a los 15 días, siempre son inferiores a los del control, con diferencias significativas a los 15 (18,3%,  $P < 0,05$ ) y 90 días (-16,2%,  $P < 0,05$ ) (figura 25).

La concentración de 5-HIAA sufre subidas significativas a los 90 (31,0%,  $P < 0,05$ ) y 180 días (65,1%,  $P < 0,01$ ), siendo menor en el enucleado con respecto al normal, salvo a los 90 días, con diferencias significativas a los 15 (-35,0%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (-44,0%,  $P < 0,05$ ) (figura 26).

El 5-Htriptofol tiene una bajada hasta los 30 días, que es significativa a los 15 (47,1%,  $P < 0,01$ ), teniendo una ligera subida a los 90 y 180 días. Su concentración en todos los estadios es inferior a la de los normales, con diferencias significativas a los 8 (-26,9%,  $P < 0,05$ ) y 180 días (-29,6%,  $P < 0,05$ ) (figura 27).

La NA sufre una ligera bajada a los 15 días (39,1%,  $P < 0,05$ ) y, a partir de esta edad, subidas significativas a los 30 (62,4%,  $P < 0,001$ ), 90 (514,9%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (41,7%,  $P < 0,05$ ). La concentración de esta catecolamina en el enucleado es menor y con diferencias significativas al compararlo con el control a los 15 (-52,4%,  $P < 0,001$ ) y 30

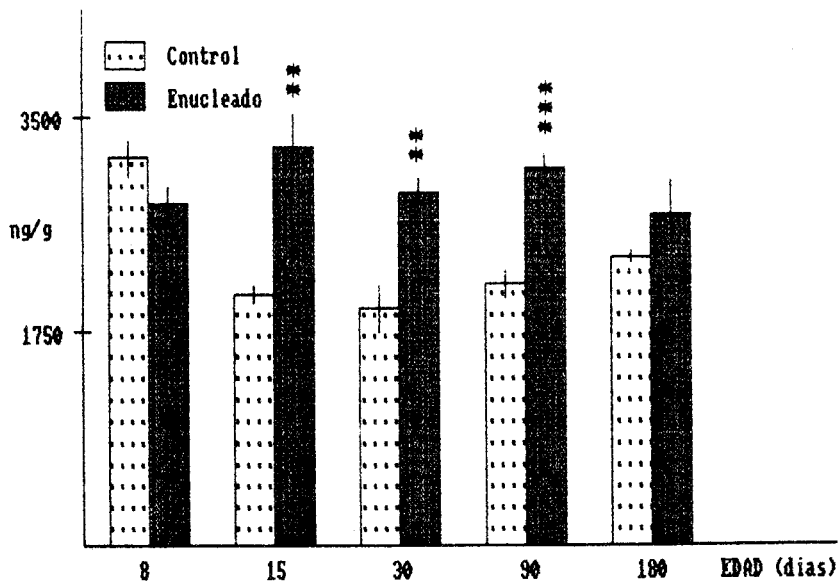


Figura 24: Concentración de triptófano en la corteza visual. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

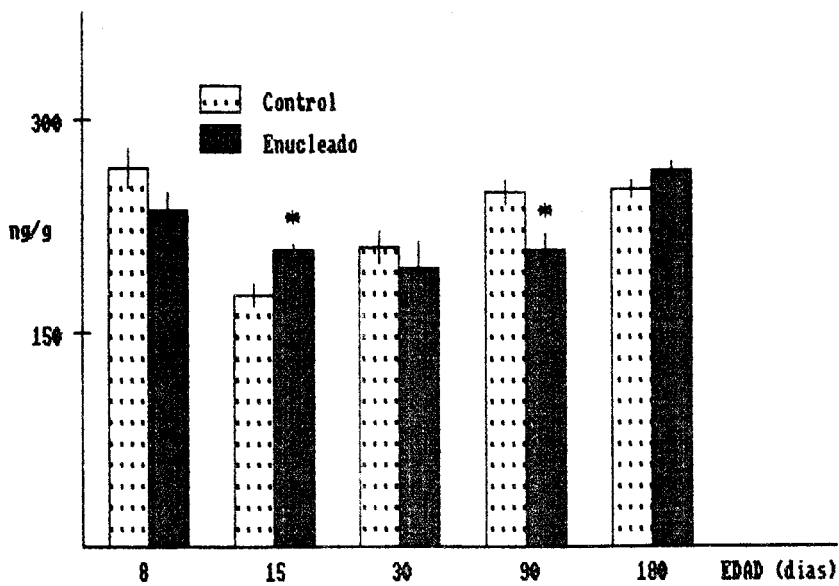


Figura 25: Concentración de serotonina en la corteza visual. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

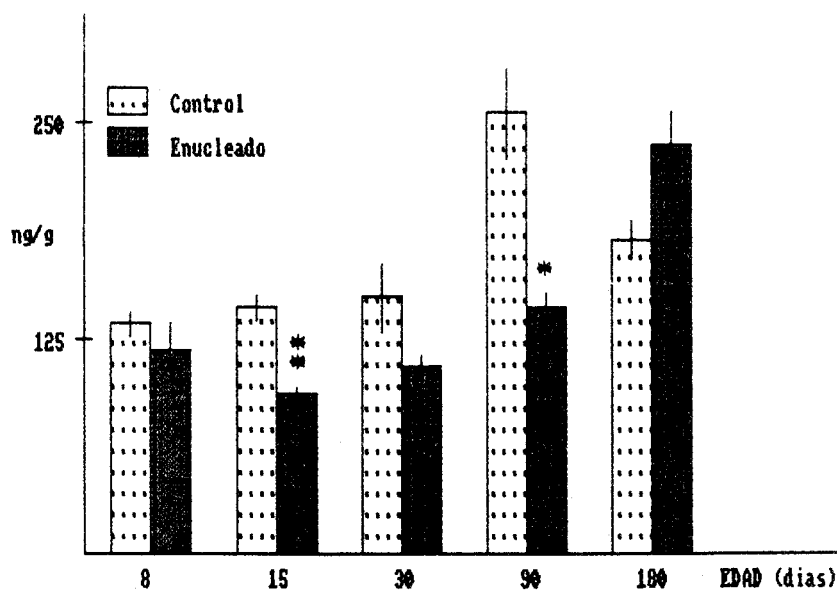


Figura 26: Concentración de ácido 5-hidroxiindolacético en la corteza visual. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

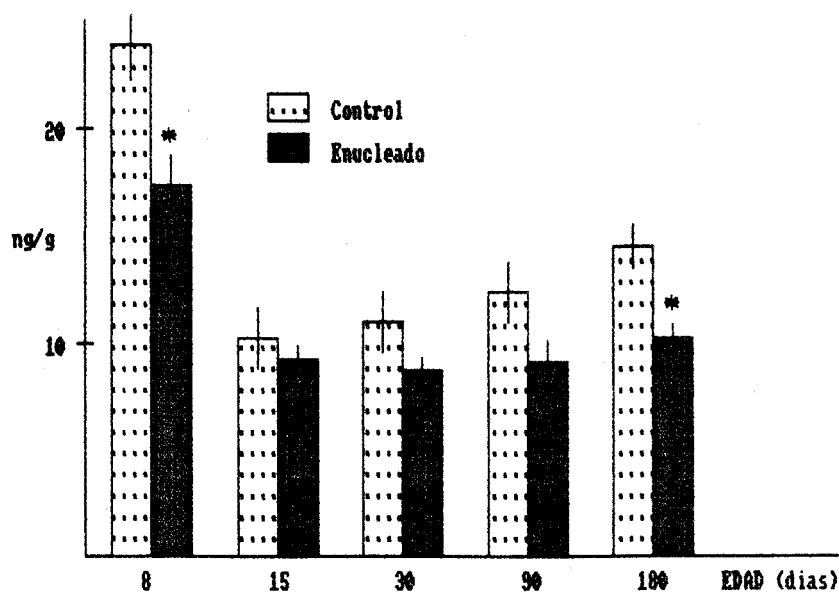


Figura 27: Concentración de 5-hidroxitriptofol en la corteza visual. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

días (-59,5%,  $P < 0,001$ ) (figura 28), pero a partir de los tres meses, debido a la fuerte subida de concentración que tiene lugar a esta edad en el enucleado, éste alcanza un nivel más alto de NA a los 90 (65,0%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (97,0%,  $P < 0,01$ ).

El MHPG tiene una subida hasta el día 30 que es significativa a los 15 (101,1%,  $P < 0,01$ ) y 30 días (173,7%,  $P < 0,001$ ), pero a los 90 días tiene una marcada bajada (85,9%,  $P < 0,001$ ) y, más tarde, una subida a los 180 días (298,6%,  $P < 0,001$ ), siendo su concentración en esta última edad casi dos veces más pequeña que la encontrada a los 30 días. A los 8, 15, 90 y 180 días la concentración en el enucleado es menor que la del control, con una diferencia significativa en la primera edad mencionada (-29,2%,  $P < 0,05$ ) y a los 90 días (-77,9%,  $P < 0,001$ ) y sólo a los 30 días la concentración de MHPG en el enucleado es aproximadamente dos veces mayor (96,0%,  $P < 0,001$ ) (figura 29).

En la NMN se produce una bajada significativa a los 15 días (44,8%  $P < 0,01$ ), luego una subida a los 30 días (218,9%,  $P < 0,05$ ) y se mantiene sin cambios a los 90 y 180 días. Si comparamos estos datos con los del normal, sus niveles son muy parecidos a los 30 días, a los 8 días los del enucleado son más altos (332,3%,  $P < 0,001$ ) y a los 15 (-47,1%,  $P < 0,01$ ), 90 (-30,8%,  $P < 0,05$ ) y 180 días (-39,7%,  $P < 0,01$ ) ocurre al revés (figura 30).

La otra catecolamina estudiada, DA, no sufre cambios significativos en el animal enucleado durante el desarrollo y el animal adulto. Sólo a los 6 meses se observan diferencias significativas (-45,2%,  $P < 0,01$ ) al comparar los datos de enucleado y control (figura 31).

En el DOPAC se observan diferencias en las últimas edades, con una bajada significativa a los 90 días (31,2%,  $P < 0,05$ ) y, más tarde, una marcada subida (125,4%,  $P < 0,001$ ). Comparando los niveles de enucleado y control, existen



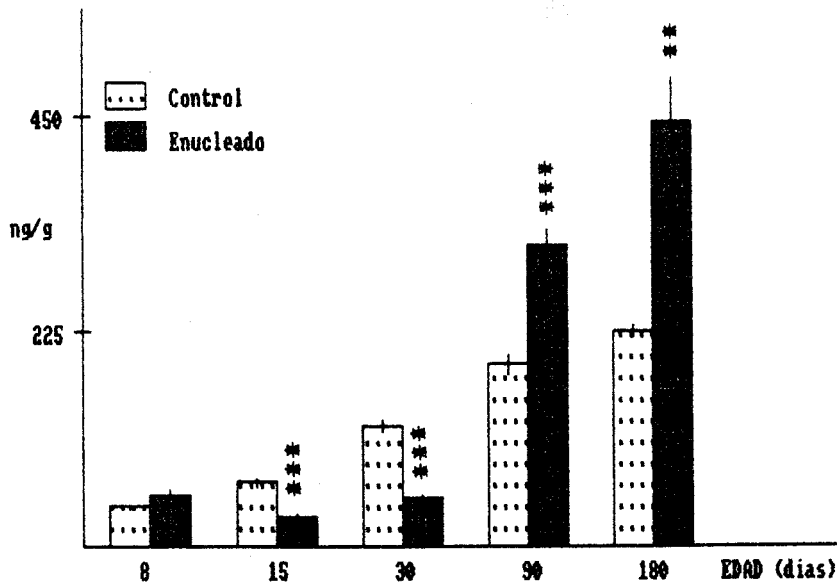


Figura 28: Concentración de noradrenalina en la corteza visual. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

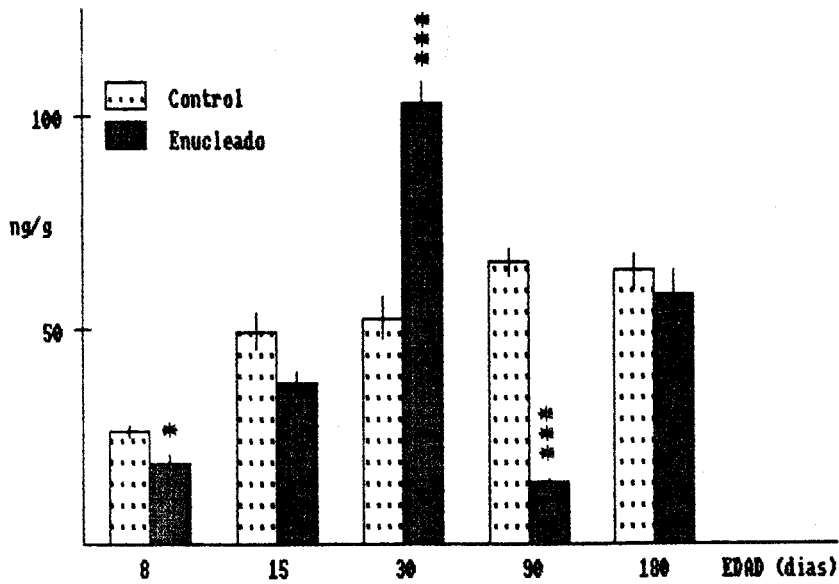


Figura 29: Concentración de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol en la corteza visual. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, comparado con el control (test t de Student).

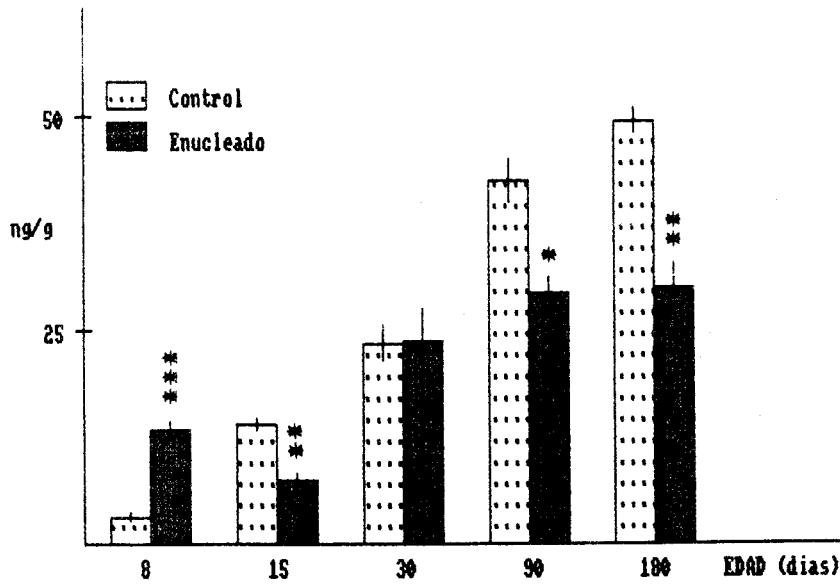


Figura 30: Concentración de normetanefrina en la corteza visual. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

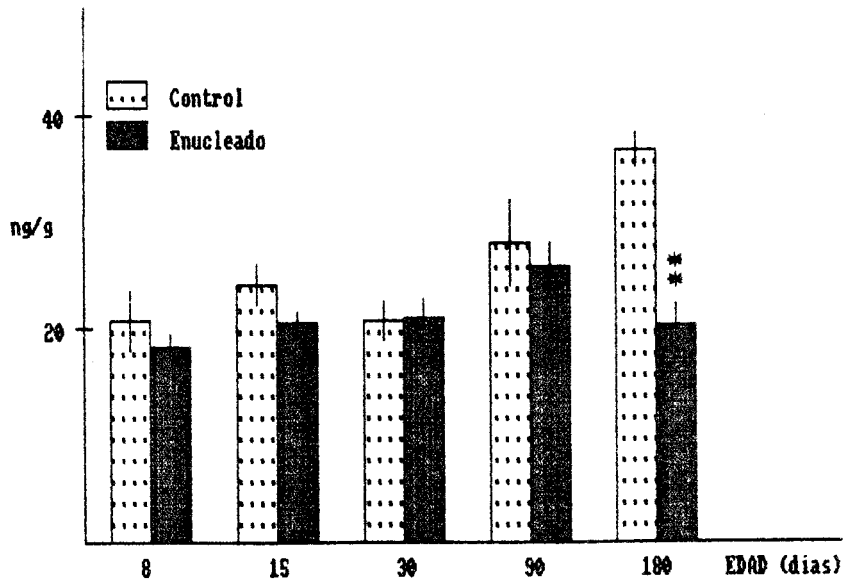


Figura 31: Concentración de dopamina en la corteza visual. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

diferencias a los 90 (-38,4%,  $P < 0,01$ ) y 180 días (61,0%,  $P < 0,001$ ) (figura 32).

El HVA tiene el mismo comportamiento que la DA, no tiene cambios en el enucleado durante todas las edades estudiadas, pero al compararlo con el control se observan diferencias significativas a los 8 (-36,8%,  $P < 0,05$ ) y 180 días (-28,2%,  $P < 0,05$ ) (figura 33).

### 3.2.2.3. Colículo superior.-

La concentración de triptófano sufre una ligera subida durante todos los estadios estudiados, pero en ningún caso este aumento es significativo. Comparando los niveles del enucleado con los del control, sólo a los ocho días son más bajos los del primero y en todas las edades se encuentran diferencias significativas: 8 (-26,3%,  $P < 0,05$ ), 15 (80,0%,  $P < 0,01$ ), 30 (103,2%,  $P < 0,01$ ), 90 (50,4%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (66,9%,  $P < 0,001$ ) (figura 34).

El 5-HTP tiene unos niveles muy similares en el enucleado durante todo el desarrollo y el animal adulto (alrededor de 8 ng/g de tejido húmedo), con una subida significativa a los 3 meses (51,4%,  $P < 0,05$ ). Los animales normales poseen una concentración más elevada a los 30 (-57,6%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (-25,9%,  $P < 0,05$ ) (figura 35), no habiendo diferencias apreciables en los demás estadios.

La 5-HT sufre una subida durante todo el desarrollo de los enucleados: 15 (59,5%,  $P < 0,001$ ), 30 (29,3%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (59,8%,  $P < 0,001$ ), estabilizándose a los 180 días. En el colículo superior se han encontrado las máximas diferencias de 5-HT al comparar los animales controles con los enucleados, siendo siempre significativas en todas las edades estudiadas: 8 (13,8%,  $P < 0,05$ ), 15 (64,4%,  $P < 0,001$ ), 30 (94,1%,  $P < 0,001$ ), 90 (137,1%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (83,0%,  $P < 0,001$ ) (figura 36).

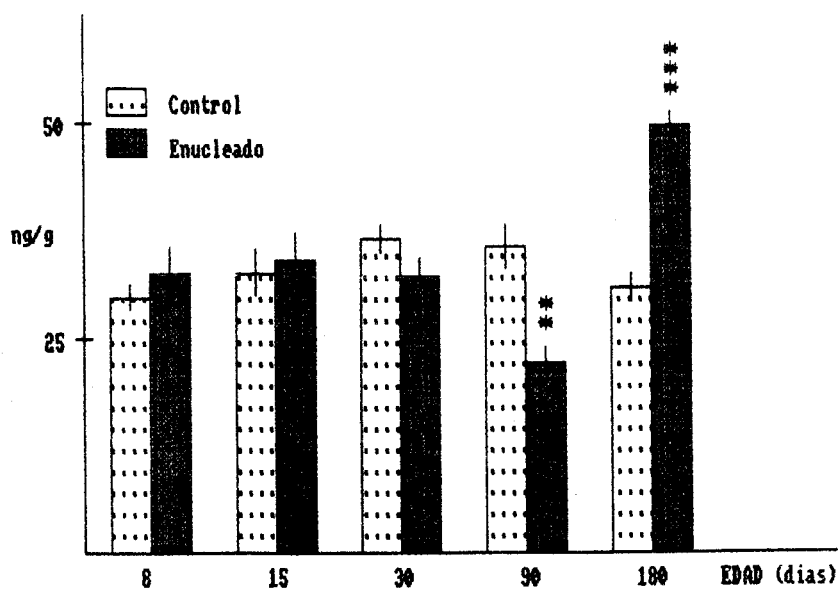


Figura 32: Concentración de DOPAC en la corteza visual. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

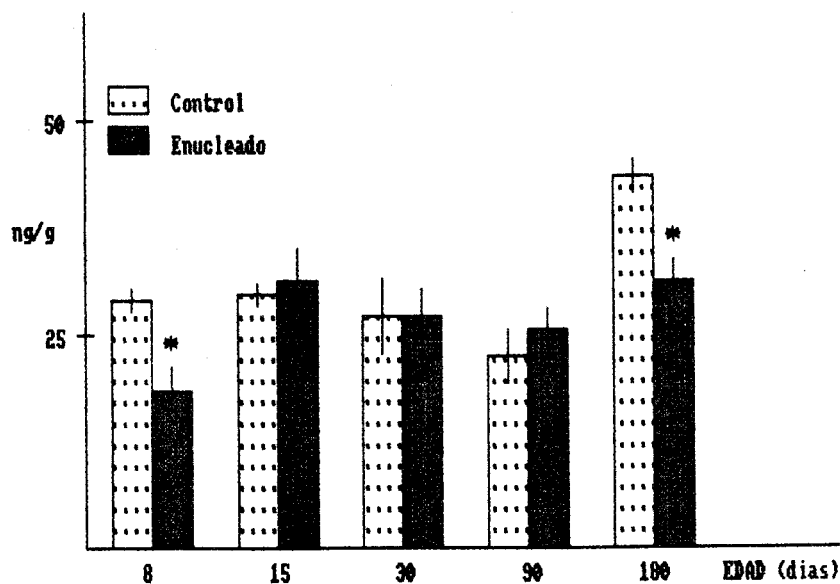


Figura 33: Concentración de ácido homovanillico en la corteza visual. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

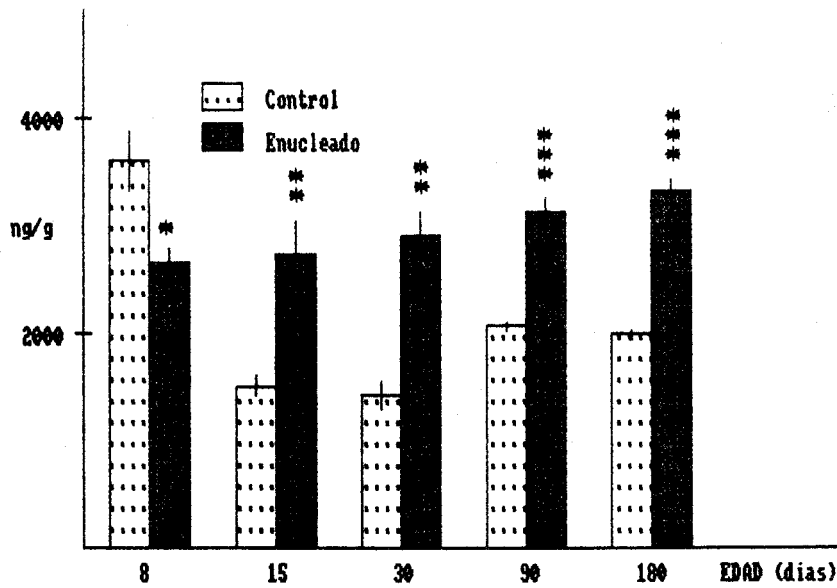


Figura 34: Concentración de triptófano en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

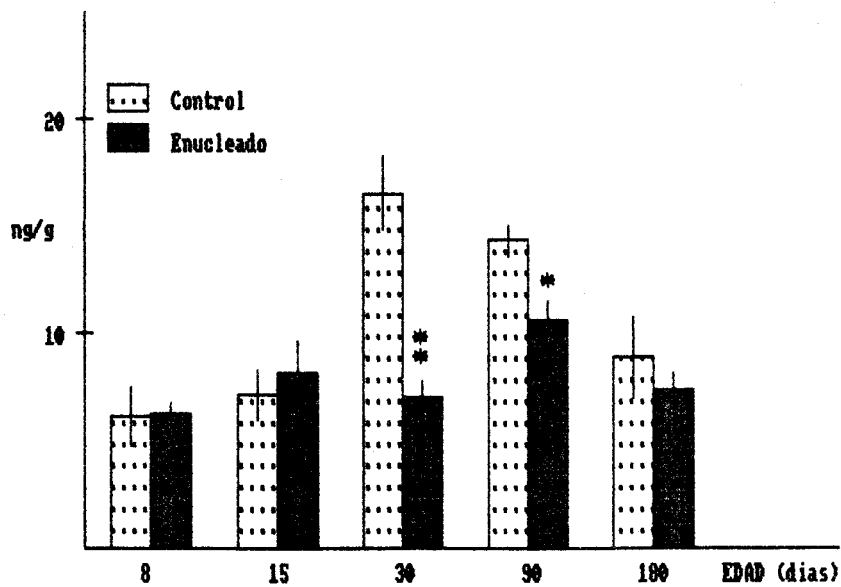


Figura 35: Concentración de 5-hidroxitriptófano en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

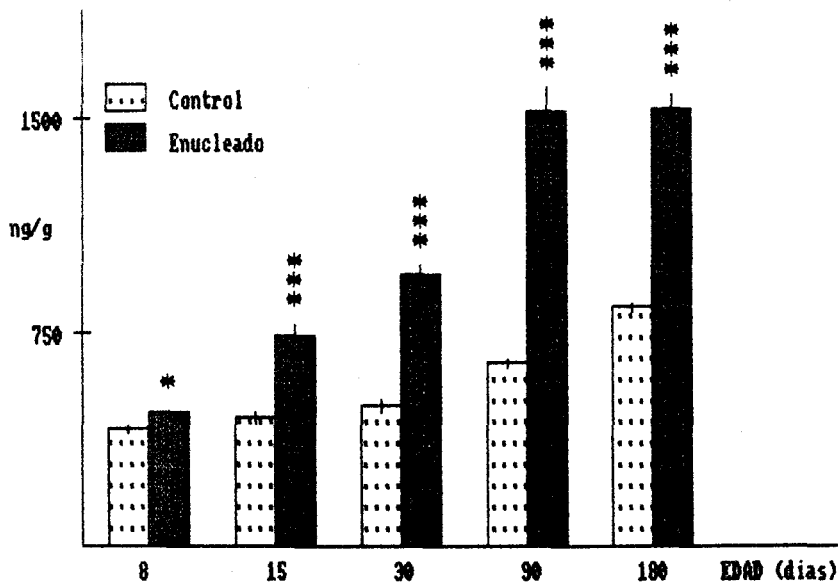


Figura 36: Concentración de serotonina en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

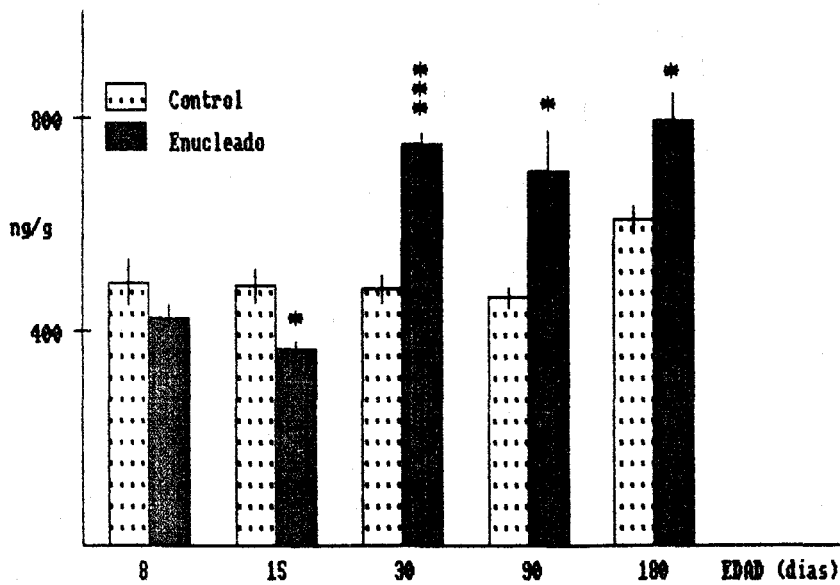


Figura 37: Concentración de ácido 5-hidroxiindolacético en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

El comportamiento del 5-HIAA en el colículo superior de un animal enucleado es muy similar al del geniculado lateral. Este metabolito del 5-HT tiene concentraciones semejantes a los 8 y 15 días por un lado y a los 30, 90 y 180 días por otro, teniendo entre ambos periodos una marcada subida (106,6%,  $P < 0,001$ ). A los 8 y 15 días su concentración es menor en el enucleado que en el control, siendo esta diferencia significativa en la última edad mencionada (-25,0%,  $P < 0,05$ ). A partir de los 30 días, los niveles del enucleado superan a los del normal, con diferencias significativas en todas las edades estudiadas: 30 (55,9%,  $P < 0,001$ ), 90 (50,8%,  $P < 0,05$ ) y 180 días (30,0%,  $P < 0,05$ ) (figura 37).

El 5-Htriptofol sufre una subida estadísticamente significativa a los 15 (34,1%,  $P < 0,05$ ), 30 (74,5%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (52,1%,  $P < 0,01$ ), permaneciendo estable a los 180 días. Comparando la concentración del control con la del enucleado, sólo se observan diferencias en los primeros estadios del desarrollo, a los 8 (-68,7%,  $P < 0,01$ ) y 15 días (-60,1%,  $P < 0,001$ ) (figura 38).

En la NA se parecía una subida durante todos los estadios estudiados, con un coeficiente de correlación  $r=0,968$ , siendo significativa en todos ellos: 15 (71,9%,  $P < 0,01$ ), 30 (125,6%,  $P < 0,001$ ), 90 (25,9%,  $P < 0,01$ ) y 180 días (73,3%,  $P < 0,001$ ). Con respecto al control, hay diferencias a los 8 (38,7%,  $P < 0,01$ ), 15 (-34,4%,  $P < 0,001$ ) y 90 días (-22,6%,  $P < 0,05$ ) (figura 39).

El MHPG no ha sido detectado a los 8 días, con una subida significativa a los 30 (1122,5%,  $P < 0,001$ ) y 90 días (43,2%,  $P < 0,05$ ). Su concentración en el enucleado se mantiene por debajo de la del normal hasta los 15 días, con diferencias significativas a esta edad (-62,3%,  $P < 0,05$ ), pero a partir de los 30 días los niveles del primero son más

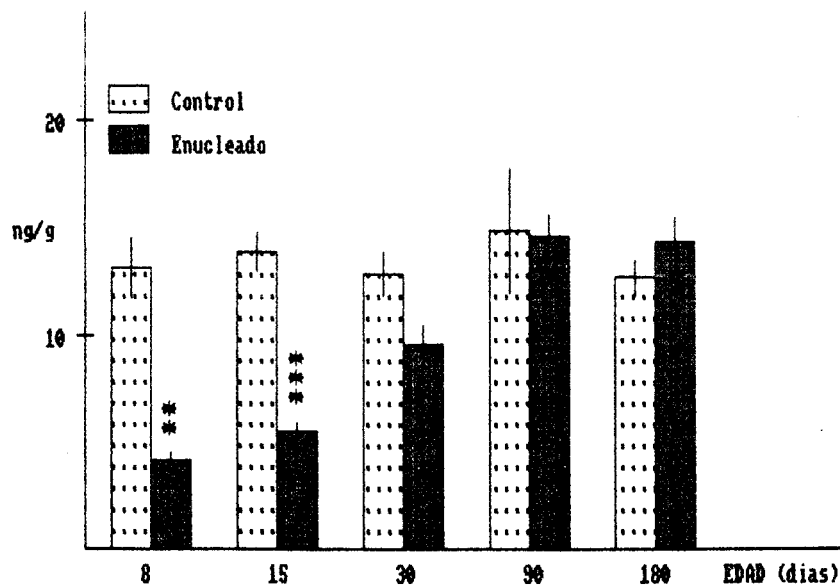


Figura 38: Concentración de 5-hidroxitriptofol en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

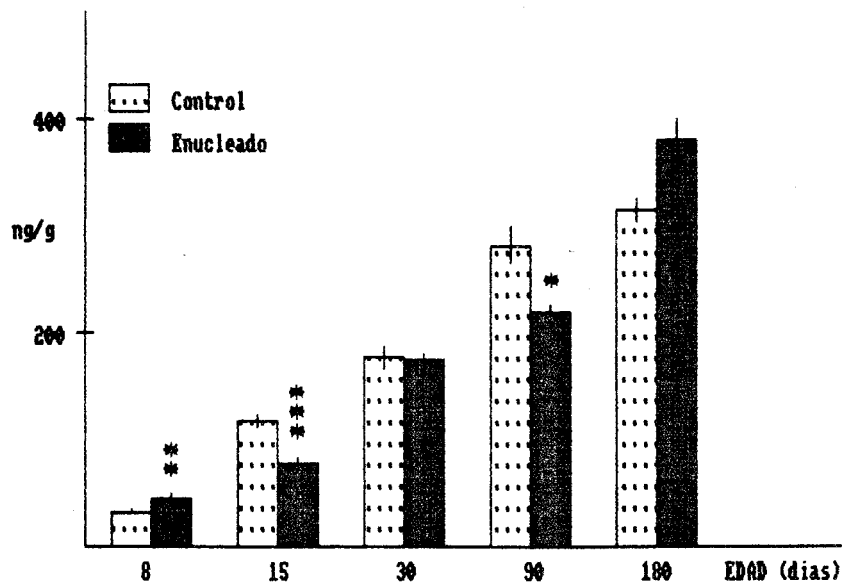


Figura 39: Concentración de noradrenalina en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).



elevados que los del segundo, con una diferencia significativa a los 180 días (-69,2%,  $P < 0,05$ ) (figura 40).

La concentración de NMN sube durante todo el desarrollo y el animal adulto, pero este aumento sólo es significativo a los 6 meses (27,5%,  $P < 0,05$ ). Al comparar los datos del enucleado con los del control, se observa que son diferentes, significativamente a los 90 (-38,1%,  $P < 0,01$ ) y 180 días (-38,0%,  $P < 0,001$ ) (figura 41), siendo en estas dos edades más altos los del control.

A diferencia de la vía visual geniculada en la que apenas se observan diferencias en la concentración de DA, en la extrageniculada se producen mayores cambios al comparar los datos de enucleado con los de control. Esta catecolamina sufre un fuerte aumento a los 30 días (229,2%,  $P < 0,001$ ), permanece estable a los 90 y 180 días y posee las más altas concentraciones de DA encontradas a partir de los 30 días en el vía visual de enucleado. Cuando se comparan con los datos de normales, existen diferencias significativas a los 8 (36,2%,  $P < 0,05$ ), 15 (-23,9%,  $P < 0,01$ ), 30 (75,9%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (49,2%,  $P < 0,01$ ). Excepto a los 15 días, en las demás edades, la concentración del enucleado es mayor que la del control (figura 42).

El DOPAC experimenta un aumento en su concentración desde los 8 a los 30 días, siendo significativo a los 15 (102,9%,  $P < 0,01$ ) y 30 días (74,5%,  $P < 0,01$ ), luego tiene una marcada bajada a los 90 días (47,6%,  $P < 0,001$ ) y una subida a los 180 días (90,3%,  $P < 0,001$ ), volviendo a tener los mismos niveles que a los 30 días. Se observan diferencias con el control a los 8 (-42,1%,  $P < 0,01$ ), 30 (85,0%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (131,6%,  $P < 0,001$ ) (figura 43).

La concentración de HVA sufre una disminución a los 15 días (45,9%,  $P < 0,01$ ), se mantiene sin cambios significativos a los 30 y 90 días y a los 180 días tiene una subida significativa (229,8%,  $P < 0,001$ ). Al igual que ocurría en la

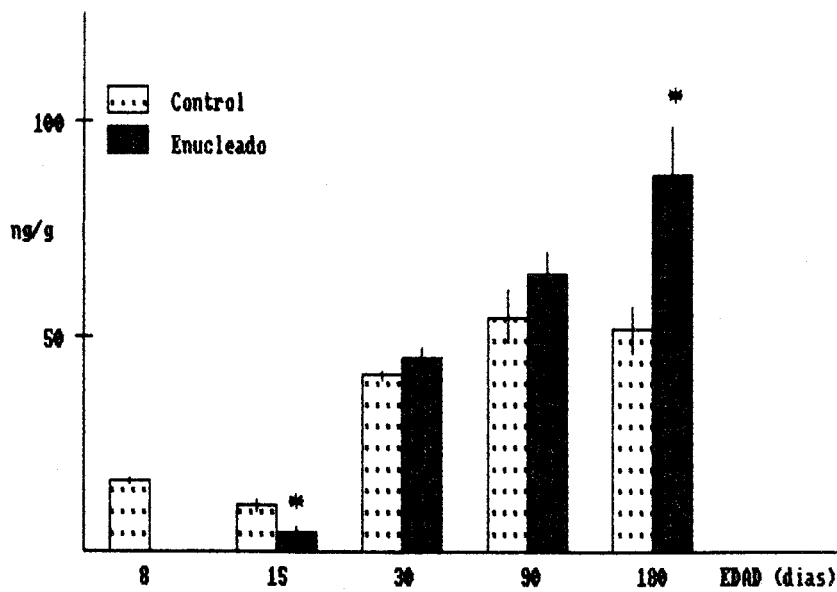


Figura 40: Concentración de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

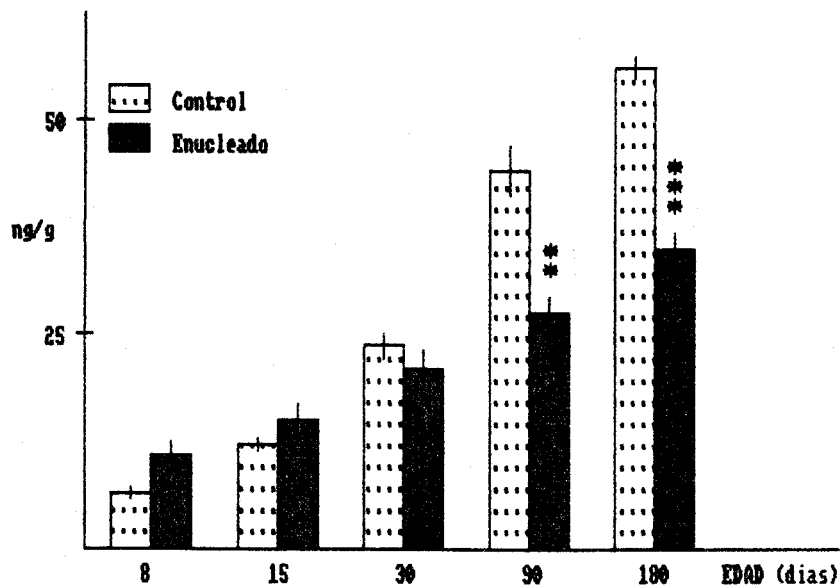


Figura 41: Concentración de normetanefrina en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

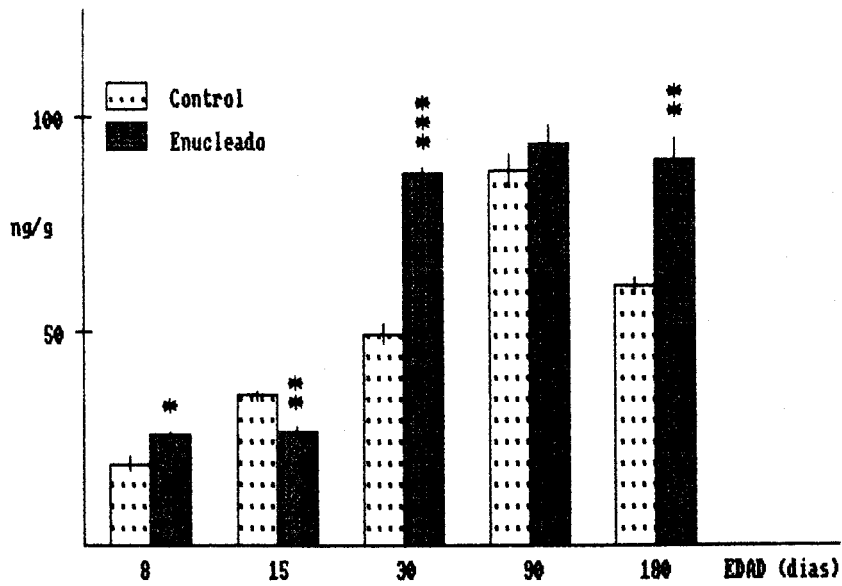


Figura 42: Concentración de dopamina en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

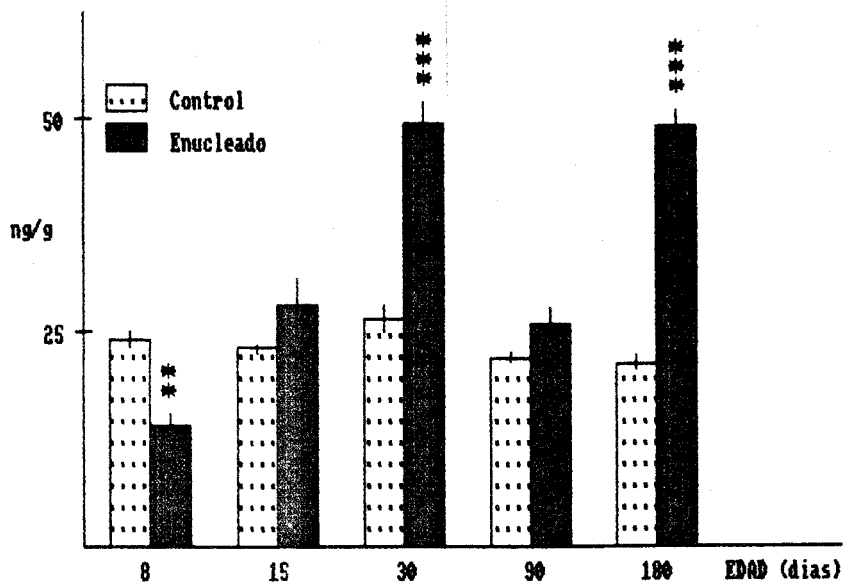


Figura 43: Concentración de DOPAC en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

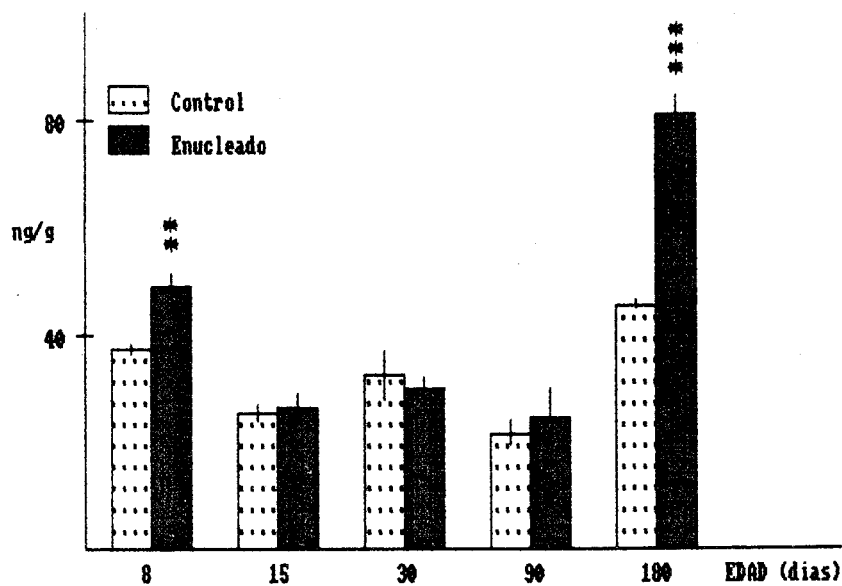


Figura 44: Concentración de ácido homovanílico en el colículo superior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

concentración de HVA de la corteza visual, en el colículo superior también se observan diferencias a los 8 (31,2%,  $P < 0,01$ ) y 180 días (77,6%,  $P < 0,001$ ) al comparar los datos de animales enucleados y controles (figura 44), pero en este caso las diferencias son más marcadas y la concentración del primero es más alta que la del segundo.

#### 3.2.2.4. Tálamo posterior. -

A diferencia de las anteriores estructuras visuales, el triptófano sufre grandes diferencias durante todos los estadios estudiados, con una bajada estadísticamente significativa a los 30 días (35,7%,  $P < 0,01$ ), más tarde experimenta una subida a los 90 días (108,6%,  $P < 0,001$ ), no apreciándose cambios a los 180 días. Sólo hemos observado diferencias significativas a los 90 días (28,6%,  $P < 0,01$ ) al compararlo con el control (figura 45).

El 5-HTP sólo tiene una marcada bajada a los 6 meses (66,7%,  $P < 0,05$ ) que coincide con una subida significativa en los animales controles (tabla 23), por lo que al compararlos hay diferencias entre ellos a esta edad (-82,5%,  $P < 0,01$ ) (figura 46). En las demás edades, excepto a los 8 días (62,5%,  $P < 0,05$ ), no existen diferencias significativas.

Al igual que en el geniculado lateral y en la corteza visual, la 5-HT sufre una ligera bajada a los 15 días y, como en el geniculado lateral, luego una subida significativa a los 30 (112,0%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (166,5%,  $P < 0,001$ ) y, más tarde, una ligera bajada a los 6 meses. Con respecto al control, las diferencias no son muy apreciables, sólo son significativas a los 8 (-17,6%,  $P < 0,05$ ) y 90 días (40,8%,  $P < 0,01$ ) (figura 47).

El 5-HIAA, por el contrario, tiene aumentos en todas las edades estudiadas, que son significativos a los 30 (60,8%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (121,5%,  $P < 0,01$ ). En el tálamo posterior

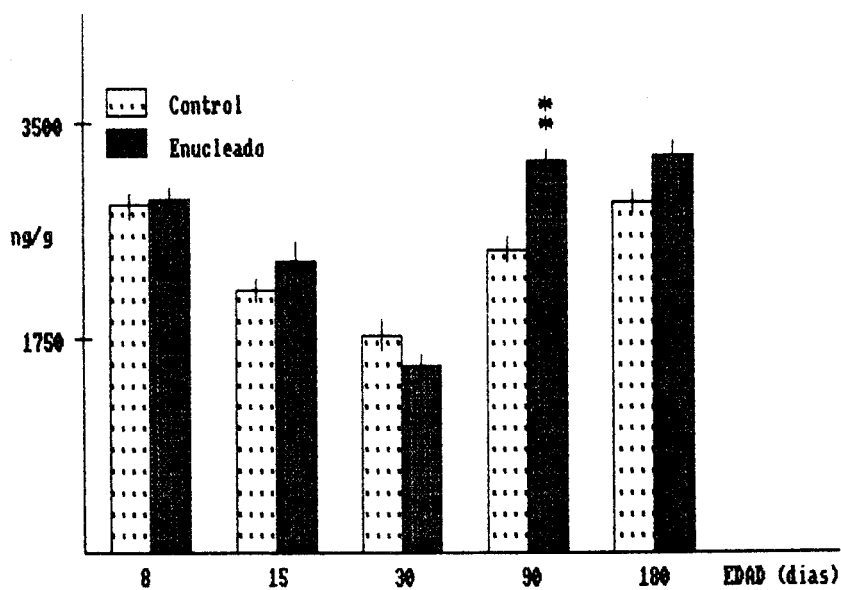


Figura 45: Concentración de triptófano en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

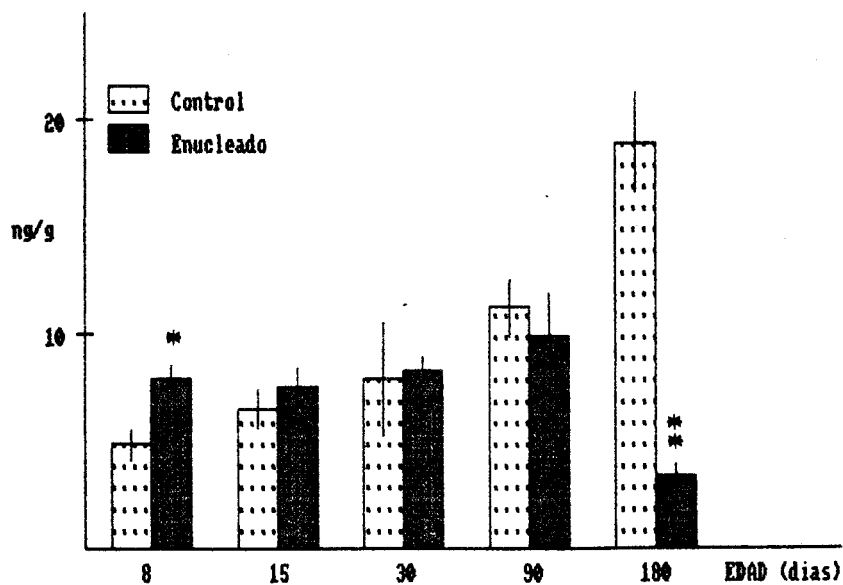


Figura 46: Concentración de 5-hidroxitriptófano en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

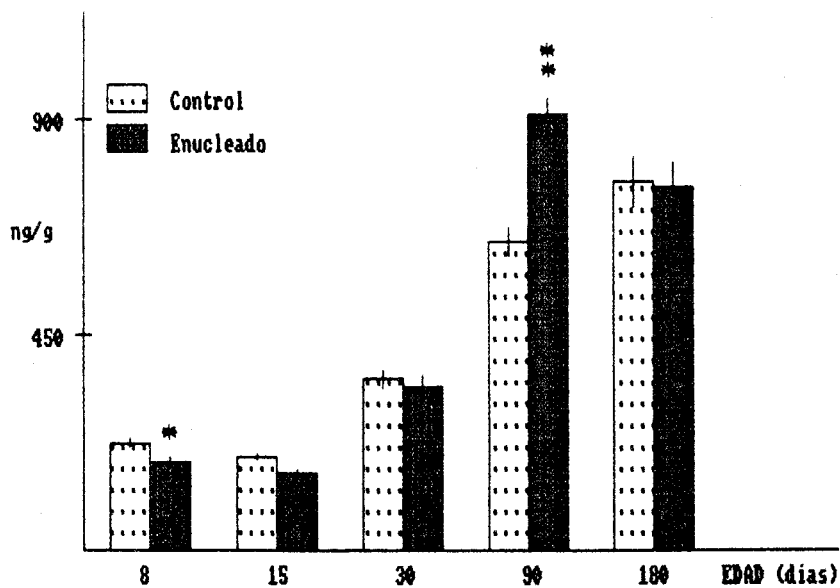


Figura 47: Concentración de serotonina en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

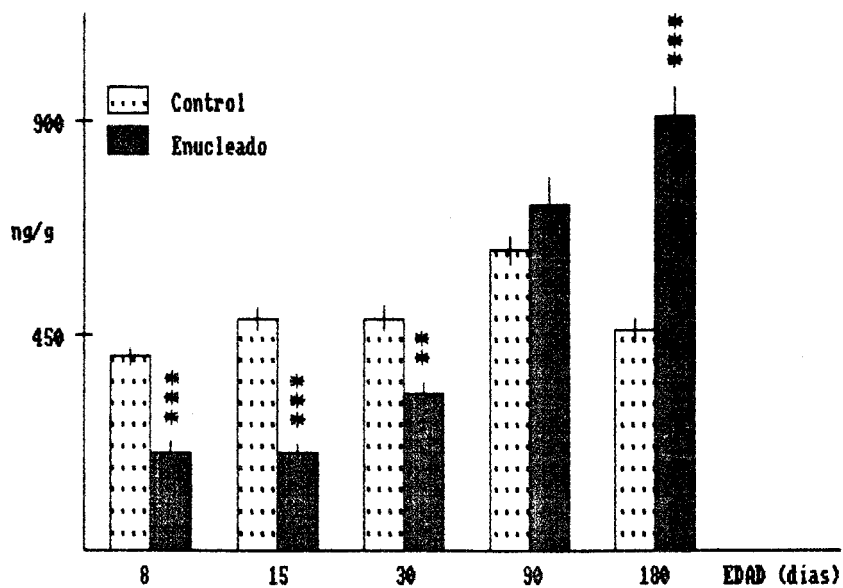


Figura 48: Concentración de ácido 5-hidroxiindolacético en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

se observan grandes diferencias en la concentración del 5-HIAA en el enucleado con respecto al normal, siendo muy significativas a los 8 (-50,4%,  $P < 0,001$ ), 15 (-57,5%,  $P < 0,001$ ), 30 (-32,5%,  $P < 0,01$ ) y 180 días (98,7%,  $P < 0,001$ ) (figura 48), aunque sólo a esta última edad y a los 90 días es mayor la concentración del enucleado que la del control.

El 5-Htriptofol se mantiene sin cambios apreciables estadísticamente durante todo el desarrollo, sólo se observa una subida significativa a los 6 meses (40,6%,  $P < 0,05$ ). Comparando los niveles del enucleado y los del normal, los del primero siempre se mantienen por debajo de los del segundo, teniendo diferencias significativas a los 15 (-53,8%,  $P < 0,05$ ) 30 (-45,3%,  $P < 0,05$ ) y 90 días (-45,4%,  $P < 0,01$ ) (figura 49).

Como en el colículo superior, la NA en el tálamo posterior sufre una subida durante todo el desarrollo y el animal adulto, que es significativa a los 15 (129,7%,  $P < 0,001$ ), 30 (88,6%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (228,9%,  $P < 0,001$ ), con un coeficiente de correlación  $r=0,960$ . Excepto a los 30 y 90 días, en que son muy similares, los niveles del enucleado son siempre más altos que los del control, con diferencias significativas a los 8 (97,5%,  $P < 0,001$ ), 15 (48,1%,  $P < 0,001$ ) y 180 días (55,6%,  $P < 0,001$ ) (figura 50).

El MHPG no ha sido detectado a los 8 días y a partir de esta edad su concentración aumenta, con un coeficiente de correlación  $r=0,980$  que es el mayor de todos los calculados en las aminas biógenas de enucleado. Esta subida es significativa a los 30 (254,1%,  $P < 0,001$ ), 90 (85,9%,  $P < 0,01$ ) y 180 días (60,8%,  $P < 0,01$ ). Al contrario de lo que sucede en la anterior catecolamina en el tálamo posterior, la concentración de MHPG en el control es siempre más alta que la del enucleado y con diferencias significativas en todas las edades estudiadas: 15 (-81,1%,  $P < 0,001$ ), 30 (-76,4%,



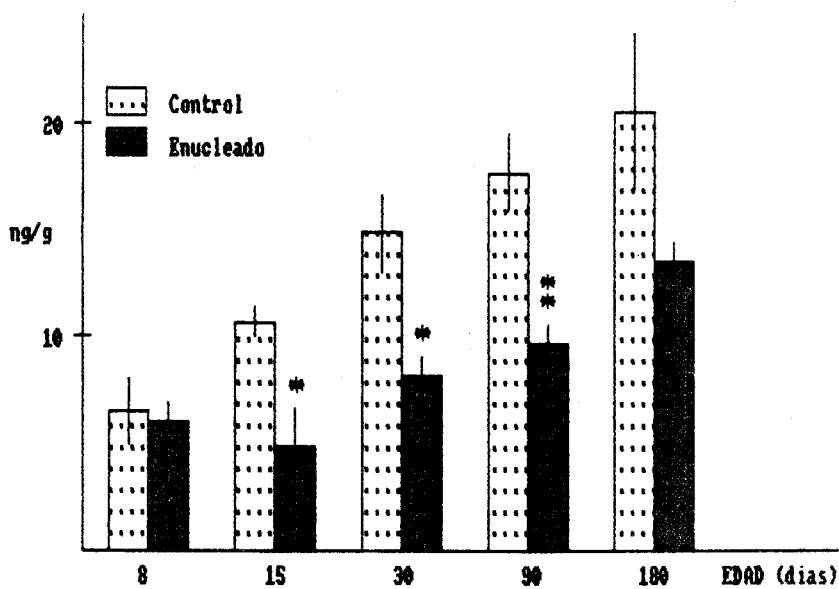


Figura 49: Concentración de 5-hidroxitriptofol en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

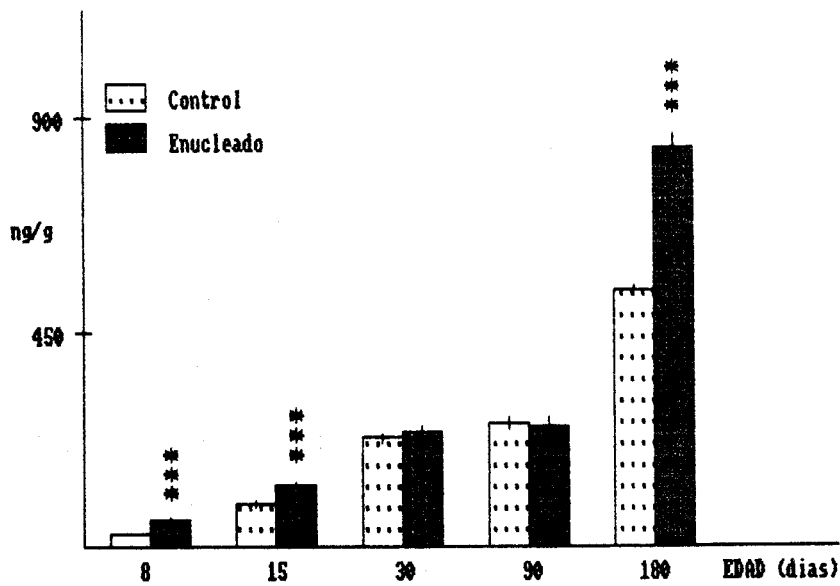


Figura 50: Concentración de noradrenalina en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

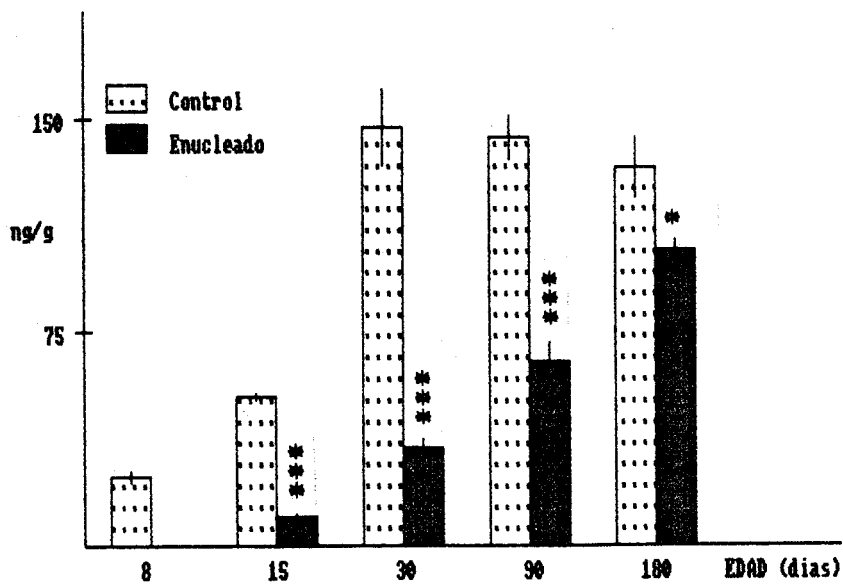


Figura 51: Concentración de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

P<0,001), 90 (-54,9%, P<0,001) y 180 días (-21,7%, P<0,05) (figura 51).

La concentración de NMN sufre unas subidas significativas a los 30 (209,2%, P<0,001) y 180 días (42,8%, P<0,01). Comparando los datos del enucleado con los del control hay diferencias significativas a los 8 (76,5%, P<0,05) y 30 días (-21,4%, P<0,05) (figura 52) y, excepto a los 8 días, los niveles del enucleado son siempre más bajos que los del control,

La DA del tálamo posterior posee una concentración en las dos primeras edades estudiadas del desarrollo muy similar a la del colículo superior. A los 30 días experimenta una subida estadísticamente significativa (134,8%, P<0,001), permaneciendo estable a los 90 y 180 Días, aunque sus niveles son más bajos que los del colículo superior. Cuando se comparan los datos de controles y enucleados, los niveles del primero son superiores a los del segundo a los 8 (-23,0%), 15 (-48,8%, P<0,01) y 180 días (-31,5%, P<0,01) y ocurre al contrario a los 30 (31,5%, P<0,01) y 90 días (8,8%) (figura 53).

El DOPAC, como la DA, vuelve a tener un comportamiento similar en esta estructura y en el colículo superior, aunque sus niveles son ligeramente mayores que en esta última área cerebral. Tiene concentraciones similares a los 8 y 15 días, con una subida significativa a los 30 (92,1%, P<0,01), una bajada a los 90 (46,9%, P<0,001) y a los 180 días, con otra subida, vuelve a alcanzar el nivel que tenía a los 30 días (116,1%, P<0,001). Comparándolos con respecto al control, existen diferencias a los 8 (-49,5%, P<0,001), 15 (-50,2%, P<0,001) y 180 días (53,7%, P<0,001) (figura 54).

El HVA sufre una fuerte bajada a los 15 días (60,7%, P<0,001) y a partir de esta edad se mantiene en unos niveles próximos a los 30 ng/g de tejido húmedo. Estas concentraciones del enucleado se mantienen siempre por

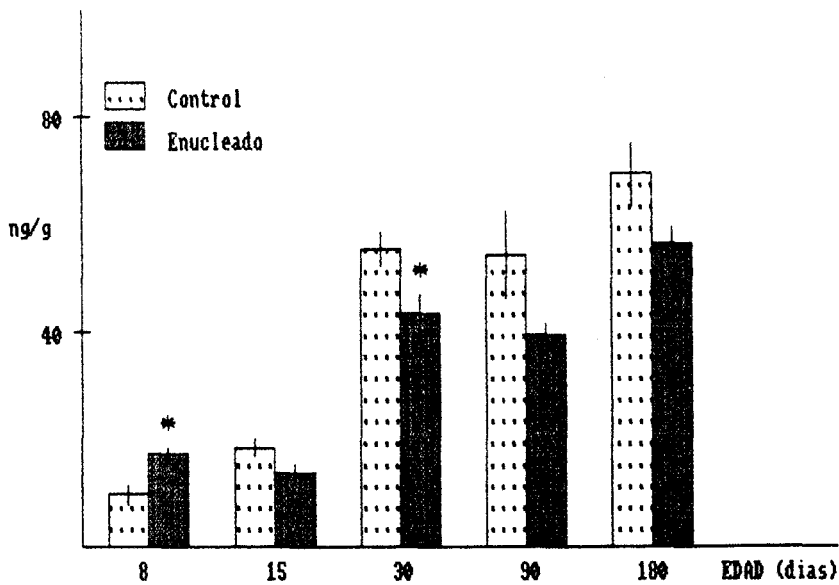


Figura 52: Concentración de normetanefrina en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

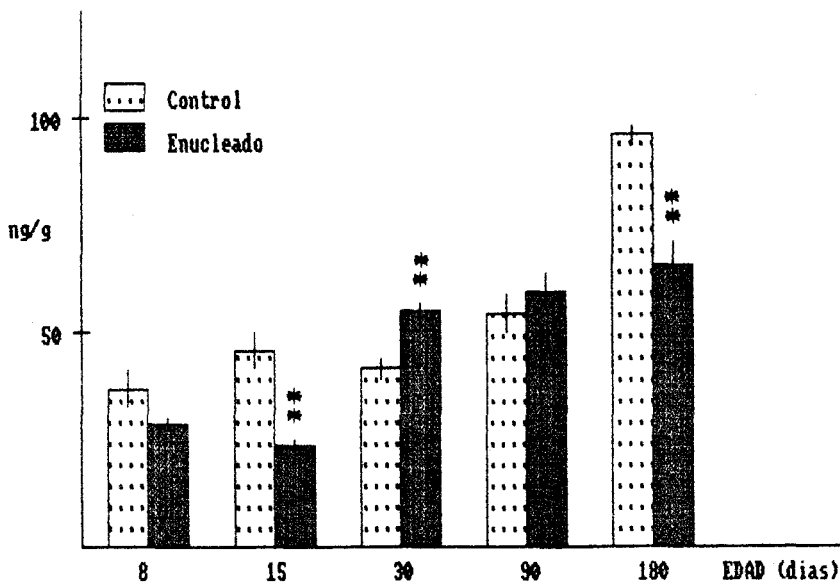


Figura 53: Concentración de dopamina en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

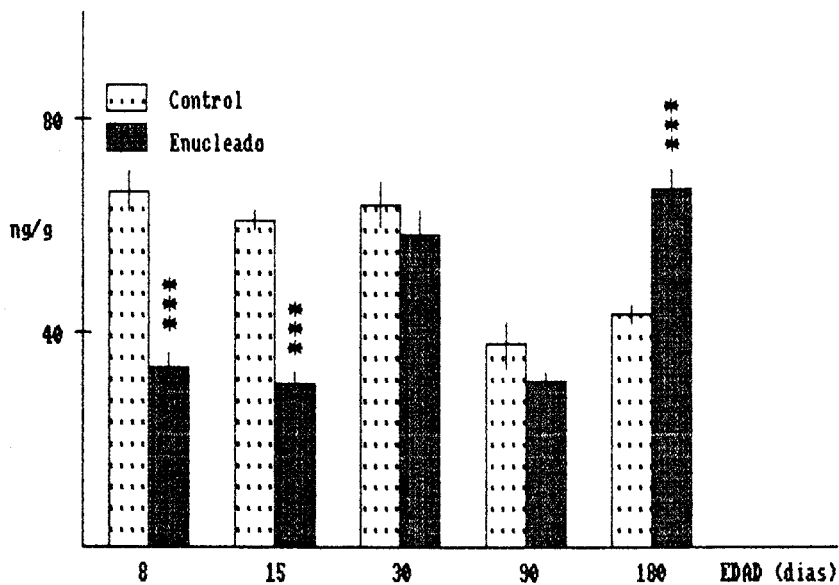


Figura 54: Concentración de DOPAC en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

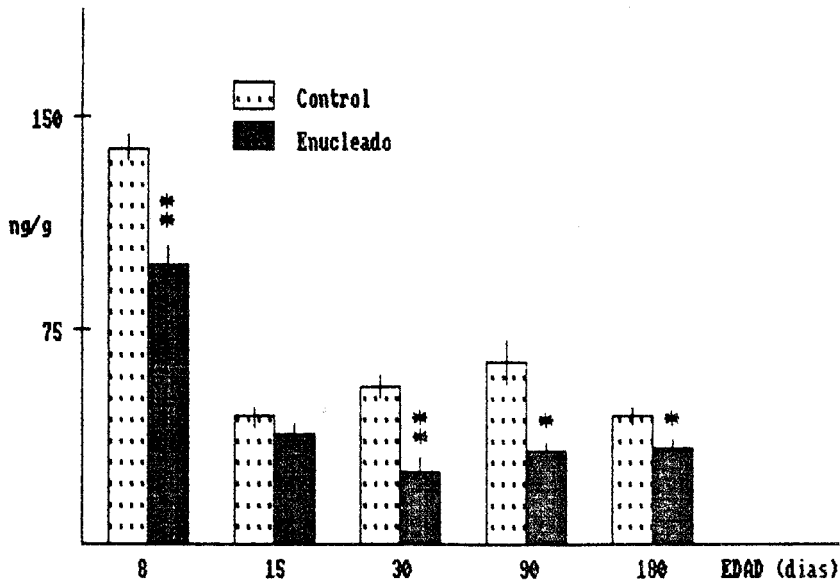


Figura 55: Concentración de ácido homovanílico en el tálamo posterior. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ , comparado con el control (test t de Student).

debajo de las del control, con diferencias significativas a los 8 (-29,7%,  $P < 0,01$ ), 30 (-54,5%,  $P < 0,01$ ), 90 (-49,0%,  $P < 0,05$ ) y 180 días (-26,3%,  $P < 0,05$ ) (figura 55).

### 3.2.3. Envejecimiento. -

#### 3.2.3.1. Geniculado lateral. -

Este periodo se caracteriza por los escasos cambios significativos encontrados en estas estructuras visuales.

De todos los componentes estudiados, el triptófano es el que lo hemos encontrado en la más alta concentración. Durante el envejecimiento no se aprecian cambios destacables, con un rango entre 1.950 y 2.535 ng/g de tejido húmedo. El 5-HTP no ha sido detectado en esta estructura visual durante todo este periodo (tabla 14).

En los dos últimos estadios, la concentración de 5-HT es la más elevada, siendo el único componente con subidas estadísticamente significativas desde los 3 a los 6 meses (56,7%,  $P < 0,01$ ), produciéndose una ligera bajada entre los 24 y 30 meses (tabla 14).

Por el contrario, el 5-HIAA se mantiene estable durante el envejecimiento, excepto a los 24 meses en los que experimenta una ligera subida, coincidiendo con la bajada de 5-HT. La razón 5-HIAA/5-HT baja en las primeras edades estudiadas, manteniéndose después alrededor de 0,75.

El 5-Htriptofol, después del 5-HTP, es el compuesto con la menor concentración y apenas tiene cambios, sufriendo una ligera disminución en este periodo, con un rango de concentración entre 11,2 y 16,8 ng/g de tejido húmedo (tabla 14).

Edad en meses	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
3	2018,3 ± 124,3 (4)	N.D.	445,9 ± 20,4 (4)	678,4 ± 31,2 (4)	16,8 ± 1,8 (4)
6	2273,4 ± 105,4 (4)	N.D.	698,7 ± 32,2 (4)**	590,1 ± 10,2 (4)	15,6 ± 1,9 (4)
12	1950,4 ± 102,3 (4)	N.D.	876,2 ± 54,4 (4)	662,8 ± 56,2 (4)	14,9 ± 1,6 (4)
24	2233,4 ± 106,5 (4)	N.D.	963,2 ± 9,5 (4)	673,3 ± 32,6 (4)	12,5 ± 1,4 (4)
30	2534,6 ± 228,0 (4)	N.D.	935,1 ± 18,1 (4)	727,8 ± 33,7 (4)	11,2 ± 1,5 (4)

Tabla 14.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos en el geniculado lateral durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

La NA en el geniculado lateral sufre una ligera subida durante todo el envejecimiento ( $r=0,976$ ), que sólo es significativa a los 12 meses (17,0%,  $P<0,05$ ) (tabla 15).

El comportamiento del MHPG es muy similar al de la NA ( $r=0,939$ ), siendo su aumento tan suave que no se aprecian cambios significativos.

La NMN, por el contrario, experimenta una disminución desde 59,7 ng/g de tejido húmedo a los 3 meses hasta 41,9 ng/g de tejido húmedo a los 30 meses (tabla 15)

La DA y sus metabolitos se caracterizan en el geniculado lateral, por sufrir todos una disminución durante este periodo. Esta catecolamina tiene un aumento desde los 3 a los 6 meses (15,4%), con una ligera bajada hasta los 30 meses (tabla 16).

El 3-MT sufre un aumento estadísticamente significativo a los 12 meses (44,2%,  $P<0,05$ ), produciéndose luego una disminución en su concentración.

En el DOPAC se observa una disminución significativa a los 6 (26,9%,  $P<0,05$ ) y 30 meses (31,9%,  $P<0,05$ ) (tabla 16).

El HVA experimenta una bajada en los primeros estadios del envejecimiento, siendo significativa a los 12 meses (25,6%,  $P<0,05$ ) y, a partir de esta edad, una ligera subida a los 24 y 30 meses.

### 3.2.3.2. Corteza visual. -

Como ocurre en el geniculado lateral, en esta estructura visual, la concentración de triptófano es elevada, sin que hayamos detectado cambios significativos. El 5-HTP tampoco ha sido detectado (tabla 17).

La 5-HT aparece en las concentraciones más bajas de las estudiadas en estos cuatro centros visuales, teniendo una bajada que sólo es estadísticamente significativa a los 30 meses (26,2%,  $P<0,05$ ) (tabla 17), lo mismo sucede con el



Edad en meses	NA	MHPG	NMN
3	258,1 ± 14,0 (7)	104,3 ± 6,9 (4)	59,7 ± 3,2 (4)
6	292,3 ± 11,5 (4)	112,7 ± 8,5 (4)	57,1 ± 4,7 (4)
12	342,0 ± 2,0 (4)*	109,4 ± 2,3 (4)	48,2 ± 5,8 (4)
24	381,6 ± 15,2 (4)	123,3 ± 7,1 (4)	47,2 ± 1,2 (4)
30	461,6 ± 40,2 (4)	138,9 ± 9,1 (4)	41,9 ± 4,5 (4)

Tabla 15.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos en el geniculado lateral durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en meses	DA	3-MT	DOPAC	HVA.
3	62,4 ± 3,8 (4)	39,8 ± 3,7 (4)	52,4 ± 3,8 (4)	76,5 ± 5,2 (5)
6	72,0 ± 3,8 (4)	33,9 ± 2,6 (4)	38,3 ± 1,9 (4)*	91,4 ± 5,8 (4)
12	64,3 ± 8,8 (4)	48,9 ± 4,6 (4)*	44,3 ± 2,4 (4)	68,0 ± 4,7 (4)*
24	60,1 ± 3,4 (4)	46,5 ± 5,0 (4)	38,2 ± 1,6 (4)	85,3 ± 4,1 (4)
30	49,1 ± 4,4 (4)	38,3 ± 3,1 (4)	26,0 ± 2,9 (4)*	71,0 ± 7,5 (4)

Tabla 16.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos en el geniculado lateral durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en meses	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
3	2127,9 ± 111,2 (4)	N.D.	248,7 ± 8,2 (4)	255,6 ± 25,9 (4)	12,4 ± 1,4 (4)
6	2365,8 ± 47,6 (4)	N.D.	250,3 ± 6,0 (4)	182,7 ± 11,3 (4)	14,5 ± 1,0 (4)
12	2441,8 ± 132,2 (4)	N.D.	194,2 ± 25,4 (4)	141,6 ± 26,6 (4)	13,2 ± 1,2 (4)
24	2668,7 ± 46,1 (4)	N.D.	238,3 ± 6,0 (4)	124,2 ± 10,4 (4)	10,1 ± 1,1 (4)
30	2682,8 ± 141,4 (4)	N.D.	175,8 ± 13,5 (4)*	113,7 ± 4,9 (4)	N.D.

Tabla 17.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos en la corteza visual durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

5-HIAA, siendo su caída de concentración tan suave que no se observan cambios significativos. El cociente 5-HIAA/5-HT disminuye a medida que la rata envejece.

Los niveles de 5-Htriptófol son muy parecidos a los del geniculado, tiene una disminución durante el envejecimiento y no ha sido detectado a los treinta meses (tabla 17).

La NA sufre un aumento durante el envejecimiento en la corteza visual, que es significativo a los 6 meses (18,7%,  $P < 0,05$ ) (tabla 18).

En el MHPG se produce una ligera disminución desde los 65,5 ng/g de tejido húmedo a los 3 meses hasta los 54,7 ng/g de tejido húmedo a los 30 meses.

La NMN experimenta una subida a los 6 meses y una bajada, que es estadísticamente significativa, a los 12 meses (16,6%,  $P < 0,05$ ) (tabla 18).

La otra catecolamina, DA, tiene una ligera subida desde los 3 a los 12 meses, una bajada estadísticamente significativa a los 24 meses (29,9%,  $P < 0,01$ ), estabilizándose a los 30 meses (tabla 19).

El 3-MT posee un perfil de envejecimiento muy parecido al de la DA, pero en ningún caso se aprecian cambios significativos.

El DOPAC, por el contrario, tiene una bajada hasta los 12 meses que nunca es significativa, una subida significativa a los 24 meses (67,1%,  $P < 0,01$ ) y una bajada a los 30 meses (46,1%,  $P < 0,01$ ).

El HVA sufre subidas significativas a los 6 (94,2%,  $P < 0,01$ ) y 24 meses (121,7%,  $P < 0,001$ ) y bajadas a los 12 (57,5%,  $P < 0,001$ ) y 30 meses (20,1%,  $P < 0,05$ ) (tabla 19).

### 3.2.3.3. Colículo superior. -

La concentración de triptófano sigue estando en el mismo rango que la de las dos anteriores estructuras, con una

Edad en meses	NA	MHPG	NMN
3	190,1 ± 9,3 (6)	65,5 ± 3,0 (4)	42,5 ± 2,5 (4)
6	225,6 ± 5,2 (4)*	63,4 ± 4,0 (4)	49,4 ± 1,4 (4)
12	265,9 ± 15,8 (4)	63,7 ± 1,5 (4)	41,2 ± 2,5 (4)*
24	289,4 ± 14,7 (4)	59,1 ± 2,3 (4)	34,8 ± 2,7 (4)
30	320,8 ± 14,2 (4)	54,7 ± 1,5 (4)	30,0 ± 2,2 (4)

Tabla 18.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos en la corteza visual durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre parentesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en meses	DA	3-MT	DOPAC	HVA
3	28,0 ± 4,0 (5)	12,7 ± 1,3 (4)	35,7 ± 2,5 (5)	22,3 ± 3,2 (4)
6	36,7 ± 1,5 (4)	17,8 ± 2,8 (4)	30,8 ± 1,5 (4)	43,3 ± 1,9 (4)**
12	40,1 ± 1,7 (4)	19,6 ± 5,2 (4)	24,0 ± 2,2 (4)	18,4 ± 2,4 (4)***
24	28,1 ± 1,8 (4)**	6,7 ± 0,3 (4)	40,1 ± 2,0 (4)**	40,8 ± 0,8 (4)***
30	31,6 ± 4,5 (4)	5,3 ± 0,6 (4)	21,6 ± 3,1 (4)**	32,6 ± 2,7 (4)*

Tabla 19.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos en la corteza visual durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

subida significativa a los 12 meses (19,3%,  $P<0,05$ ) (tabla 20).

El 5-HTP experimenta una disminución durante todo este periodo de manera que, aunque no es significativa, a los 30 meses no lo hemos detectado.

La 5-HT tiene una subida estadísticamente significativa a los 6 meses (30,3%,  $P<0,001$ ), lo mismo que ocurre con el 5-HIAA (31,8%,  $P<0,01$ ), sin embargo, mientras en el primero se observa una ligera bajada a partir de los 12 meses, en el segundo se observa una subida, que en ningún caso es significativa (tabla 20). Su razón 5-HIAA/5-HT se mantiene bastante estable, alrededor de 0,7, durante todo este periodo, excepto a los 12 meses, en el cual existe una disminución.

El 5-Htriptofol muestra cambios destacados en esta estructura durante el envejecimiento, con una subida a los 12 meses (60,6%,  $P<0,01$ ) y, más tarde, una bajada a los 24 (29,4%,  $P<0,05$ ) y 30 meses (50,7%,  $P<0,01$ ) (tabla 20).

La NA tiene una subida significativa a los 12 meses (14,0%,  $P<0,05$ ), estabilizándose su concentración a partir de esta edad.

En el MHPG, aunque se produce una bajada hasta los 12 meses, también se mantiene estable a los 24 y 30 meses (tabla 21).

La concentración de NMN es alrededor de los 45 ng/g de tejido húmedo a los 3, 12 y 24 meses y en los otros dos estadios sufre un aumento significativo a los 6 meses (27,2%,  $P<0,05$ ) y una disminución a los 12 (17,5%,  $P<0,01$ ) y 30 meses (40,9%,  $P<0,05$ ) (tabla 21).

La DA sufre bajadas significativas a los 6 (30,8%,  $P<0,01$ ) y 24 meses (27,7%,  $P<0,05$ ) y subidas a los 12 (66,2%,  $P<0,001$ ) y 30 meses (19,6%).

Edad en meses	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
3	2065,9 ± 42,5 (4)	14,3 ± 0,7 (4)	643,8 ± 13,3 (4)	463,5 ± 18,3 (4)	14,8 ± 2,9 (4)
6	1992,9 ± 38,2 (4)	8,8 ± 1,9 (4)	839,0 ± 16,1 (4)****	611,0 ± 25,1 (4)***	12,7 0,8 (4)
12	2298,1 ± 69,1 (4)*	6,9 ± 0,7 (4)	912,7 ± 24,1 (4)	543,0 ± 24,6 (4)	20,4 ± 1,2 (4)***
24	2445,9 ± 42,3 (4)	3,5 ± 1,0 (4)	845,7 ± 13,2 (4)	565,2 ± 22,8 (4)	14,4 ± 1,5 (4)*
30	2586,9 ± 195,3 (4)	N.D.	834,0 ± 16,4 (4)	592,9 ± 24,1 (4)	7,1 ± 0,6 (4)***

Tabla 20.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos en el colículo superior durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).



Edad en meses	NA	MHPG	NMN
3	282,6 ± 15,4 (4)	54,5 ± 6,0 (4)	44,1 ± 2,8 (4)
6	315,0 ± 10,5 (4)	51,7 ± 5,4 (4)	56,1 ± 1,2 (4)*
12	359,0 ± 9,5 (4)*	44,1 ± 2,7 (4)	46,3 ± 1,8 (4)**
24	346,5 ± 12,5 (4)	45,3 ± 3,4 (4)	47,9 ± 5,6 (4)
30	354,0 ± 7,7 (4)	48,1 ± 3,8 (4)	28,3 ± 2,9 (4)*

Tabla 21.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos en el colículo superior durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en meses	DA	3-MT	DOPAC	HVA
3	87,2 ± 3,9 (6)	13,4 ± 1,2 (4)	21,8 ± 0,5 (4)	21,6 ± 2,3 (4)
6	60,3 ± 2,0 (4)***	19,3 ± 1,8 (4)	21,2 ± 0,8 (4)	45,5 ± 0,8 (4)***
12	100,2 ± 4,2 (4)***	19,4 ± 2,3 (4)	24,3 ± 2,3 (4)	52,4 ± 6,2 (4)
24	72,4 ± 7,4 (4)*	19,6 ± 1,6 (4)	33,7 ± 0,4 (4)*	85,7 ± 1,7 (4)**
30	86,6 ± 3,6 (4)	20,2 ± 2,1 (4)	31,0 ± 2,0 (4)	88,1 ± 4,6 (4)

Tabla 22.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos en el colículo superior durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

En el 3-MT solo se observa una ligera subida desde los 3 a los 6 meses (44,0%) y se mantiene alrededor de los 19 ng/g de tejido húmedo a los 6, 12, 24 y 30 meses (tabla 22).

El DOPAC se mantiene en concentraciones muy similares en los primeros estadios del envejecimiento (3, 6 y 12 meses), pero a los 24 meses aumenta significativamente (38,7%,  $P < 0,05$ ) y a los 30 meses no tiene cambios significativos (tabla 22).

El HVA comienza en el envejecimiento con una marcada subida a los 6 meses (110,6%,  $P < 0,001$ ), se mantiene estable a los 12 meses, vuelve a subir a los 24 meses (63,5%,  $P < 0,01$ ) y no tiene cambios significativos a los 30 meses (tabla 22).

#### 3.2.3.4. Tálamo posterior. -

La concentración de triptófano, en esta estructura, es más alta que en las anteriores áreas, con una subida estadísticamente significativa a los 6 meses (19,3%,  $P < 0,05$ ) y luego se mantiene sin cambios alrededor de los 3.000 ng/g de tejido húmedo (tabla 23). El 5-HTP también tiene una subida significativa a los 6 meses (68,7%,  $P < 0,05$ ) y una bajada a partir de esta edad, no habiendo sido detectado al final del envejecimiento.

La 5-HT experimenta una bajada significativa a los 12 meses (25,8%,  $P < 0,05$ ) y una subida a los 24 meses (32,8%,  $P < 0,001$ ) (tabla 23). El 5-HIAA tiene una disminución estadísticamente significativa a los 6 meses (27,1%,  $P < 0,01$ ).

Al igual que ocurre en el geniculado lateral y colículo superior, en la 5-HT se produce una disminución de su concentración a partir de los 24 meses (14,4%,  $P < 0,05$ ), mientras que el 5-HIAA aumenta de su concentración (32,1%,  $P < 0,05$ ). La razón entre estas dos últimas indolaminas es

Edad en meses	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
3	2473,3 ± 93,2 (4)	11,2 ± 1,3 (4)	644,7 ± 26,8 (4)	627,9 ± 27,3 (4)	17,6 ± 1,9 (4)
6	2951,0 ± 88,1 (5)*	18,9 ± 2,3 (4)*	768,5 ± 49,5 (4)	457,8 ± 22,3 (5)***	20,5 ± 3,6 (4)
12	2923,3 ± 86,6 (4)	13,6 ± 1,8 (4)	570,0 ± 8,9 (4)*	502,0 ± 52,3 (4)	20,7 ± 1,8 (4)
24	3090,5 ± 71,3 (4)	11,2 ± 1,2 (4)	757,1 ± 22,4 (4)****	465,5 ± 25,7 (4)	22,8 ± 1,2 (4)
30	3196,2 ± 286,7 (4)	N.D.	648,3 ± 28,6 (4)*	615,0 ± 30,6 (4)*	N.D.

Tabla 23.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos en el tálamo posterior durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

bastante irregular, debido a que su comportamiento es diferente.

La concentración de 5-Htriptofol en el tálamo posterior, como la de triptófano, es la mas alta de las encontradas en estas cuatro estructuras visuales, aunque no ha sido detectado a los 30 meses (tabla 23).

La concentración de NA en el tálamo posterior durante el envejecimiento es muy similar a la del geniculado lateral y colículo superior a los tres meses (tablas 15, 21 y 24), pero a partir de esta edad esta catecolamina sufre en el tálamo posterior una marcada subida a los 6 (107,3%,  $P < 0,001$ ), 24 (62,2%,  $P < 0,001$ ) y 30 meses (34,5%,  $P < 0,01$ ), teniendo un coeficiente de correlación  $r = 0,978$  y alcanzando a los 30 meses en esta estructura visual una concentración de NA, alrededor de 4 veces mayor que en las otras estructuras visuales (tabla 24).

El MHPG experimenta una bajada hasta los 12 meses y posteriormente una subida a los 24 y 30 meses, que en ningún caso son significativas.

La concentración de NMN sube en todos los estadios del envejecimiento, con un coeficiente de correlación  $r = 0,956$  y sólo es significativa esta subida a los 24 meses (22,2%,  $P < 0,01$ ) (tabla 24).

La DA alcanza en el tálamo posterior, un nivel muy similar al del colículo superior, con subidas significativas a los 6 (76,3%,  $P < 0,001$ ) y 30 meses (37,4%,  $P < 0,05$ ) y con una bajada a los 12 meses (19,9%,  $P < 0,05$ ) (tabla 25).

El 3-MT lo hemos encontrado en unas concentraciones muy similares a los 3 y 6 meses por una parte y a los 12, 24 y 30 meses por otra, teniendo entre los 6 y 12 meses una disminución estadísticamente significativa (42,0%,  $P < 0,01$ ).

La concentración de DOPAC apenas varía durante todo el envejecimiento del tálamo posterior y es aproximadamente igual a los 40,0 ng/g de tejido húmedo.

Edad en meses	NA	MHPG	NMN
3	259,3 ± 11,8 (7)	143,0 ± 7,6 (4)	54,5 ± 7,9 (4)
6	537,6 ± 11,5 (5)****	132,5 ± 10,2 (4)	69,3 ± 5,7 (4)
12	582,9 ± 18,8 (4)	110,1 ± 6,0 (4)	74,7 ± 2,5 (4)
24	945,3 ± 19,3 (4)****	126,8 ± 13,0 (4)	91,3 ± 2,9 (4)**
30	1271,9 ± 53,5 (4)**	137,7 ± 11,7 (4)	92,5 ± 5,6 (4)

Tabla 24.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos en el tálamo posterior durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en meses	DA	3-MT	DOPAC	HVA.
3	54,4 ± 4,4 (4)	31,1 ± 3,0 (4)	37,8 ± 4,3 (4)	63,1 ± 7,5 (5)
6	95,9 ± 2,1 (4)****	34,5 ± 1,8 (4)	43,6 ± 1,4 (5)	45,2 ± 2,6 (5)
12	76,8 ± 4,4 (4)*	20,0 ± 1,9 (4)**	39,1 ± 5,1 (4)	56,1 ± 9,6 (4)
24	79,2 ± 5,5 (4)	19,5 ± 4,8 (4)	40,3 ± 1,9 (4)	80,6 ± 2,4 (4)
30	108,8 ± 8,0 (4)*	24,2 ± 1,8 (4)	47,9 ± 4,3 (4)	83,7 ± 8,6 (4)

Tabla 25.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos en el tálamo posterior durante el envejecimiento. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Aunque los cambios de la concentración del HVA entre los diferentes estadios del envejecimiento son mayores que los del DOPAC en esta estructura, en ningún caso son significativos. Este compuesto sufre una ligera bajada hasta los 12 meses y luego una subida hasta los 30 meses (tabla 25).

#### 3.2.4. Estudio morfológico del geniculado lateral.-

En nuestro estudio hemos usado el geniculado lateral de animales viejos (31 meses) y animales bien nucleados al nacer y sacrificados a los 31 meses.

En la figura A se observa una gran terminal retiniana (R). Esta tiene una forma irregular y usualmente entre 1,3-3,3  $\mu\text{m}$  de diámetro. La característica más típica son las mitocondrias, con una matriz electro-clara y con pocas crestas tubulares. Estas terminales retinianas forman sinapsis asimétricas con las dendritas. También estas retinianas hacen sinapsis con otros procesos. En esta misma figura se pueden observar terminales retinianas haciendo sinapsis asimétrica con una terminal que contienen vesículas, presumiblemente una interneurona. Estos procesos se encuentran encapsulados por procesos gliales formando un glomérulo.

En la figura B, que pertenece a un animal bien nucleado, se observa una larga terminal (T) conteniendo vesículas redondas y mitocondrias con una matriz electro-densa y haciendo varios contactos asimétricos con una dendrita. Como en los animales controles estos procesos neuronales están encapsulados por procesos gliales formando un glomérulo.



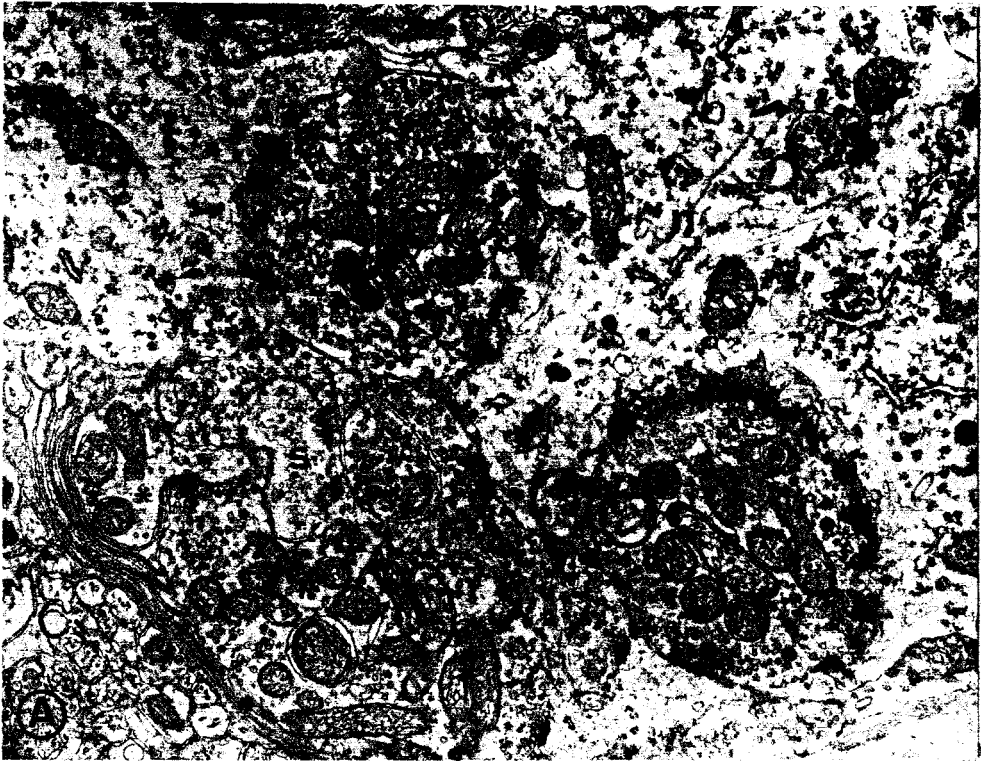
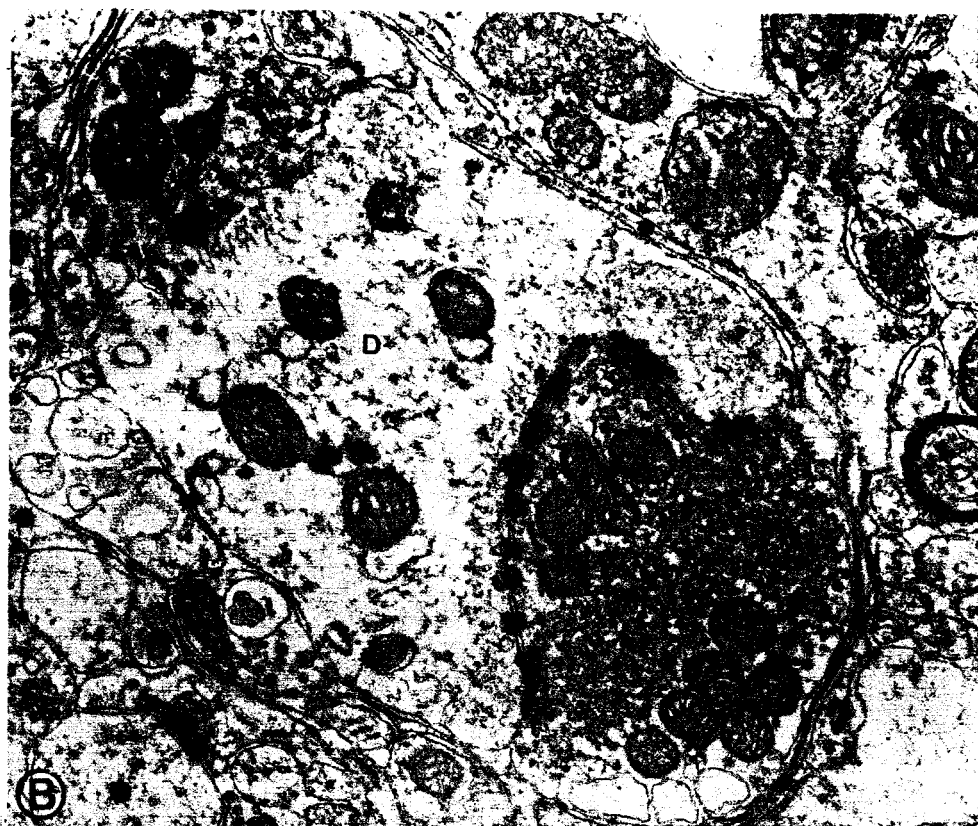


Figura A.- Núcleo geniculado lateral de rata control (31 meses). Cuerpo neuronal (n), terminales retinianas haciendo contacto con una espina dendrítica (s), terminales retinianas asociadas con otros procesos neuronales (\*) y encapsuladas mediante astroglía (\*). Aumentada x 25.000.



-Figura B.- Núcleo geniculado lateral de rata bienucleada (31 meses). Dendrita (D) haciendo varios contactos asimétricos con una terminal (T). Procesos neuronales encapsulados por la astroglía (\*). Aumentada x 31.000.

### 3.3. Núcleo caudado-putamen. -

#### 3.3.1. Desarrollo. -

En el recién nacido, la concentración de triptófano es la más alta de todos los componentes estudiados (Tabla 26), a pesar de que es el único que disminuyó significativamente a los 8 (29,6%,  $P < 0,01$ ) y 15 días (21,2,  $P < 0,05$ ), estabilizándose en este nivel. El 5-HTP se encuentra en muy baja concentración hasta los noventa días, momento éste, en el que se produce un aumento muy significativo (318,5%,  $P < 0,01$ ). El 5-HTP, al igual que la 5-HT y el 5-HIAA, poseen unos buenos coeficientes de correlación de  $r = 0,987$ ;  $0,974$  y  $0,994$ , respectivamente.

A partir del día 15, la 5-HT, al igual que el 5-HIAA, su principal catabolito, sufren un aumento estadísticamente significativo a los 30 (124,7%,  $P < 0,001$  y 58,6%,  $P < 0,01$ , respectivamente) y 90 días (101,3%,  $P < 0,001$  y 83,6%,  $P < 0,01$ , respectivamente), alcanzando en el adulto un aumento de alrededor de 3,5 y 4 veces, respectivamente, mayor que el valor inicial (tabla 26).

El 5-Htriptofol no ha sido detectado a los 0 y 8 días y aparece en esta estructura en cantidades muy bajas si se compara con los otros componentes, con una subida estadísticamente significativa a los 30 días (14,3%,  $P < 0,01$ ) (tabla 26).

La concentración de NA en el recién nacido es muy baja, tiene un aumento estadísticamente significativo a los 8 días (75,9%,  $P < 0,001$ ), y, más tarde, un descenso a los 15 días (34,7%,  $P < 0,001$ ). A partir del día 15 permanece sin diferencia estadísticamente significativa hasta el final del periodo estudiado, alcanzando en este estadio su nivel adulto (tabla 27).

Edad en días	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
0	5160,9 ± 195,1 (6)	8,9 ± 1,8 (4)	176,6 ± 13,5 (5)	118,0 ± 6,5 (6)	N.D.
8	3630,7 ± 189,5 (4)**	6,7 ± 0,8 (5)	180,1 ± 10,0 (5)	131,2 ± 5,5 (5)	N.D.
15	2861,2 ± 58,2 (4)*	19,5 ± 1,6 (4)***	137,2 ± 7,2 (4)*	166,5 ± 11,7 (4)*	7,0 ± 0,6 (4)
30	2647,6 ± 209,6 (4)	25,4 ± 6,4 (4)	308,3 ± 13,4 (8)***	264,0 ± 16,2 (4)**	15,0 ± 1,6 (4)**
90	2905,9 ± 131,7 (6)	106,3 ± 13,3 (4)**	620,7 ± 8,7 (4)***	484,6 ± 37,1 (4)**	14,6 ± 1,3 (4)

Tabla 26.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos durante el desarrollo en el núcleo caudo-putamen de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en días	NA	MHPG	NMN
0	34,9 ± 4,1 (4)	N. D.	N. D.
8	61,4 ± 1,3 (5)***	20,9 ± 1,7 (4)	5,5 ± 0,1 (4)
15	40,1 ± 1,4 (5)***	45,6 ± 3,6 (4)**	21,2 ± 1,6 (4)***
30	45,2 ± 3,0 (7)	72,1 ± 8,5 (4)**	37,5 ± 3,4 (4)
90	54,0 ± 2,8 (5)	102,3 ± 3,5 (4)**	68,2 ± 1,7 (4)*

Tabla 27.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos durante el desarrollo en el núcleo caudo-putamen de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

El contenido de NMN y MHPG, metabolitos de la NA, no ha sido detectado en el recién nacido, sus concentraciones se incrementan durante el desarrollo, alcanzando, respectivamente, valores de 12 y 5 veces mayores que los iniciales y unos coeficientes de correlación de 0,967 y 0,912. La mayor subida se produce en el MHPG, con valores siempre estadísticamente significativos cuando se comparan con los del estadio anterior: 15 días (118,2%,  $P < 0,01$ ), 30 días (58,1%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (41,9%,  $P < 0,01$ ) (tabla 27). La NMN experimenta una marcada subida a los 15 días (285,4%,  $P < 0,001$ ) y otra a los 90 días (81,9%,  $P < 0,05$ ) (tabla 27).

El núcleo caudo-putamen es una estructura cerebral que, tanto en el recién nacido como durante el desarrollo, posee una elevada concentración de DA y sus metabolitos.

Esta amina biógena tiene un aumento estadísticamente significativo a los 8 (217,8%,  $P < 0,001$ ), 15 (41,3%,  $P < 0,01$ ) y 90 días (58,1%,  $P < 0,001$ ), siendo su nivel en esta última edad alrededor de ocho veces mayor que el del recién nacido (Tabla 28) y posee un coeficiente de correlación de 0,93. En el animal adulto, su concentración es alrededor de 11 y 130 veces mayor que las concentraciones de 5-HT y NA, respectivamente (Tablas 26, 27 y 28).

Entre sus metabolitos, el DOPAC ha sido el que ha alcanzado los niveles más altos, teniendo en el adulto, una concentración alrededor de 16 veces mayor que la del valor inicial, con un perfil de desarrollo muy similar al de la DA y con el mayor coeficiente de correlación encontrado entre los de la DA y sus metabolitos ( $r=0,965$ ).

El 3-MT se encontró en muy baja concentración en el recién nacido, sin embargo, a los 3 meses alcanzó valores muy similares a los del HVA, aumentando su concentración alrededor de 20 veces, desde los 0 hasta los 90 días (Tabla 28), teniendo subidas significativas a los 8 (147,1%,

Edad en días	DA	3-MT	DOPAC	HVA
0	837,7 ± 27,8 (5)	39,3 ± 2,3 (4)	251,4 ± 19,9 (5)	129,2 ± 5,8 (6)
8	2662,1 ± 153,2 (5)***	97,1 ± 5,2 (5)***	710,4 ± 26,6 (4)***	509,6 ± 29,0 (5)***
15	3763,0 ± 190,0 (9)**	285,5 ± 11,2 (5)***	1466,0 ± 28,4 (9)***	714,2 ± 15,7 (5)***
30	4437,6 ± 255,4 (8)	630,1 ± 18,0 (4)***	2423,6 ± 47,5 (8)***	958,5 ± 19,6 (4)***
90	7014,5 ± 88,1 (4)***	800,2 ± 28,6 (6)**	4071,5 ± 105,9 (6)***	966,2 ± 38,9 (4)

Tabla 28.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos durante el desarrollo en el núcleo caudo-putamen de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

P<0,001), 15 (194,0%, P<0,001), 30 (120,7%, P<0,001) y 90 días (27,0%, P<0,01).

El DOPAC experimenta subidas estadísticamente significativas en todos los estadios del desarrollo, a los 8 (182,6%, P<0,001), 15 (106,4%, P<0,001), 30 (65,3%, P<0,001) y 90 días (68,0%, P<0,001) (tabla 28).

Por último, en el HVA también se aprecia un aumento durante este periodo, pero el nivel adulto se alcanza antes que el de otros metabolitos (30 días), antes de esta edad tiene aumentos significativos a los 8 (294,4%, P<0,001), 15 (40,1%, P<0,001) y 30 días (34,2%, P<0,001) y el más bajo coeficiente de correlación  $r=0,728$ .

### 3.3.2. Envejecimiento. -

La tabla 29 muestra el perfil de la 5-HT y sus metabolitos durante el envejecimiento. Como puede observarse, el triptófano posee la máxima concentración después de la DA, ésta se mantiene alrededor de 2.900 ng/g de tejido húmedo y experimenta una ligera subida a los 30 meses (31,2%, P<0,05). El 5-HTP apenas varía durante este periodo, sólo se produce una bajada significativa a los 12 meses (17,9%, P<0,05).

La 5-HT disminuye entre los 24 y 30 meses (33,6%, P<0,001).

El 5-HIAA tiene una disminución estadísticamente significativa a los 12 meses (44,8%, P<0,01) y a partir de esta edad sufre un aumento que es significativo a los 24 meses (32,7%, P<0,01) (tabla 29).

El 5-Htriptofol se mantiene estable durante el envejecimiento, con una concentración próxima a los 15 ng/g de tejido húmedo.



Edad en meses	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
3	2905,9 ± 83,7 (4)	106,3 ± 13,3 (4)	620,7 ± 8,7 (4)	484,6 ± 37,1 (4)	14,6 ± 1,3 (4)
6	3035,6 ± 208,5 (4)	115,2 ± 2,0 (4)	702,2 ± 45,6 (4)	520,6 ± 35,0 (4)	13,2 ± 1,7 (4)
12	2825,6 ± 173,6 (4)	94,6 ± 4,6 (4)*	621,2 ± 8,5 (4)	287,4 ± 11,7 (4)**	15,4 ± 1,3 (4)
24	2655,5 ± 101,3 (4)	97,6 ± 2,0 (4)	620,3 ± 18,5 (4)	381,4 ± 8,5 (4)**	16,8 ± 2,1 (4)
30	3484,8 ± 258,5 (4)*	115,8 ± 8,2 (4)	411,8 ± 16,3 (4)***	447,5 ± 32,1 (4)	16,3 ± 1,5 (4)

Tabla 29.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos durante el envejecimiento en el núcleo caudo-putamen de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

La tabla 30 muestra los perfiles que hemos obtenido durante el envejecimiento de la NA y sus metabolitos, NMN y MHPG.

Como puede observarse, la concentración máxima de NA ha sido encontrada a los 6 meses de edad, en los que existe un aumento significativo (66,5%,  $P < 0,001$ ), después se produce una disminución hasta los 12 meses (34,8%,  $P < 0,001$ ), estabilizándose su valor a partir de esta edad (tabla 30). Como en el desarrollo, esta catecolamina tiene el más bajo nivel de todas las aminas biógenas estudiadas.

La concentración de MHPG experimenta una disminución durante el envejecimiento que, en ningún caso, es significativa.

La NMN sufre una bajada estadísticamente significativa a los 6 (14,4%,  $P < 0,05$ ) y 12 meses (54,6%,  $P < 0,001$ ) y, en el último estadio del envejecimiento, un aumento (53,2%,  $P < 0,01$ ) (tabla 30).

Como puede verse en la tabla 31, en este periodo de la vida de la rata el núcleo caudo-putamen posee una elevada concentración de DA. Sus máximos niveles se encuentran a los 6 meses de edad en los que se produce una subida significativa (84,0%,  $P < 0,001$ ), siendo alrededor de 18 y 145 veces mayores que los de la 5-HT y NA, respectivamente, se mantienen estabilizados hasta los 24 meses. A partir de esta edad, se produce una disminución estadísticamente significativa (22,3%,  $P < 0,001$ ) en la concentración de este compuesto.

Junto con la disminución de la DA existe un ligero aumento del 3-MT (13,1%). Al mismo tiempo, se produce un incremento en la concentración de DOPAC (44,2%,  $P < 0,001$ ) y, especialmente, HVA (66,1%,  $P < 0,001$ ) (tabla 31). El DOPAC tiene una disminución significativa a los 6 meses (21,4%,  $P < 0,05$ ), manteniéndose sin cambios hasta los 24 meses. El

Edad en meses	NA	MHPG	NMN
3	54,0 ± 2,8 (5)	102,3 ± 3,5 (4)	68,2 ± 1,7 (4)
6	89,9 ± 3,4 (4)***	102,4 ± 12,5 (4)	58,4 ± 2,8 (4)*
12	58,6 ± 2,0 (5)***	72,9 ± 2,9 (5)	26,5 ± 2,1 (4)***
24	66,3 ± 6,7 (4)	76,5 ± 7,1 (4)	28,2 ± 2,0 (4)
30	72,4 ± 9,6 (4)	81,4 ± 6,3 (4)	43,2 ± 2,6 (4)**

Tabla 30.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos durante el envejecimiento en el núcleo caudo-putamen de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en meses	DA	3-MT	DOPAC	HVA
3	7014,5 ± 88,1 (4)	800,2 ± 28,6 (4)	4071,5 ± 105,9 (4)	966,2 ± 38,9 (4)
6	12907,8 ± 591,1 (4)****	932,9 ± 48,9 (4)	3201,4 ± 242,5 (4)*	984,5 ± 67,9 (4)
12	12534,5 ± 181,1 (4)	843,9 ± 13,0 (4)	2943,3 ± 100,9 (4)	845,5 ± 23,7 (4)
24	12654,2 ± 231,1 (4)	753,2 ± 36,7 (4)	3150,1 ± 118,1 (4)	726,5 ± 45,0 (4)
30	9831,2 ± 117,6 (4)****	851,7 ± 31,2 (4)	4543,8 ± 96,0 (4)****	1206,9 ± 52,9 (4)****

Tabla 31.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos durante el envejecimiento en el núcleo caudo-putamen de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

HVA experimenta una ligera disminución desde los 6 hasta los 24 meses, pero en ningún caso es significativa.

### 3.4. Hipocampo. -

#### 3.4.1. Desarrollo. -

Como puede verse en la tabla 32, la concentración de tritpófano es la más alta de todas las encontradas en esta estructura cerebral. Este aminoácido sufre una disminución durante el desarrollo hasta el día 15 (0-8 días: 40,2%,  $P < 0,001$ ; 8-15 días: 42,5%,  $P < 0,01$ ), no encontrándose diferencias significativas hasta el adulto.

El 5-HTP no ha sido detectado en este periodo, sólo a los 3 meses que lo hemos encontrado en muy baja concentración (6,0 ng/g de tejido húmedo).

La 5-HT experimenta un aumento estadísticamente significativo en este periodo, con subidas a los 8 (76,4%,  $P < 0,001$ ), 15 (31,3%,  $P < 0,01$ ), 30 (31,2%,  $P < 0,001$ ) y 90 días (10,8%,  $P < 0,05$ ) (tabla 32).

El 5-HIAA sufre un aumento estadísticamente significativo a los 8 (93,7%,  $P < 0,001$ ), 15 (78,5%,  $P < 0,001$ ) y 30 días (24,9%,  $P < 0,001$ ), permaneciendo sin cambios en el último estadio del desarrollo. Los datos en los adultos (3 meses) de estos dos últimos compuestos están de acuerdo con varios autores (Kim et al., 1983; Westerink, 1983; Hallman y Jonsson, 1984).

El 5-Htriptofol aparece en esta estructura en pequeñas cantidades, con un rango entre 7,4 y 10,4 ng/g de tejido húmedo, no produciéndose cambios significativos durante el desarrollo (tabla 32).

En la tabla 33 se muestran las concentraciones de NA y sus metabolitos encontradas en el hipocampo. Esta

Edad en días	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
0	8615,4 ± 379,4 (6)	N.D.	78,5 ± 3,4 (7)	58,6 ± 5,4 (6)	10,1 ± 1,1 (4)
8	5155,4 ± 442,2 (6)***	N.D.	138,5 ± 4,4 (6)***	113,5 ± 5,2 (6)***	10,4 ± 0,9 (4)
15	2963,8 ± 100,1 (4)**	N.D.	181,8 ± 9,7 (10)**	202,6 ± 6,9 (12)***	7,8 ± 0,7 (4)
30	2930,0 ± 132,7 (4)	N.D.	238,6 ± 4,9 (8)***	253,1 ± 9,0 (7)***	8,9 ± 0,5 (8)
90	3100,4 ± 69,2 (4)	6,0 ± 0,9 (4)	264,5 ± 10,7 (4)*	318,3 ± 34,6 (4)	10,1 ± 1,1 (4)

Tabla 32.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos durante el desarrollo en el hipocampo de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

catecolamina posee un aumento estadísticamente significativo durante todo este periodo (0-8 días: 79,9%,  $P < 0,001$ ; 8-15 días: 26,3%,  $P < 0,01$ ; 15-30 días: 120,0%;  $P < 0,001$ ; 30-90 días: 93,3%,  $P < 0,001$ ), con un coeficiente de correlación  $r = 0,989$ .

La cantidad de NA en la rata adulta (3 meses) mostrada en la tabla 33 es similar a la encontrada por otros investigadores (Maruyana y Kusaka, 1979; Mefford et al., 1980; Kim et al., 1983; Westerink, 1983; Hallman y Jonsson, 1984; Ikarashi et al., 1985).

Ninguno de los metabolitos de la NA han sido detectados en el recién nacido. El MHPG, el principal metabolito de la NA en el cerebro, lo hemos encontrado en las mayores cantidades, apreciándose un ligero aumento durante el desarrollo y al llegar a los 3 meses experimenta una subida significativa (56,6%,  $P < 0,05$ ) (tabla 33).

La NMN sufre un incremento estadísticamente significativo desde los 8 a los 15 días (81,8%,  $P < 0,05$ ) y desde los 15 a los 30 días (142,5%,  $P < 0,001$ ), permaneciendo estable en los siguientes estadios. La MN, metabolito de la adrenalina, sólo la hemos detectado en muy baja concentración a los 3 meses de edad.

La tabla 34 muestra el contenido de DA y sus metabolitos. Esta amina biógena experimenta un ligero aumento durante todo el desarrollo, pero en ninguno de las edades estudiadas es estadísticamente significativo. El nivel adulto (3 meses) que hemos encontrado, está de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Mefford et al., 1980; Westerink y Mulder, 1981; Kim et al., 1983).

El 3-MT posee los más bajos valores de todos los metabolitos de la DA (con un rango entre 4,1 y 10,9 ng/g de tejido húmedo). Es el único que no ha sido detectado en el recién nacido, con un aumento significativo a los 90 días (36,2%,  $P < 0,05$ ) (tabla 34).

Edad en días	NA	MHPG	NMN	MN
0	32,8 ± 2,5 (6)	N. D.	N. D.	N. D.
8	59,0 ± 2,7 (5)***	19,3 ± 2,9 (4)	4,4 ± 0,6 (4)	N. D.
15	74,5 ± 2,5 (12)**	21,4 ± 0,7 (4)	8,0 ± 1,0 (5)*	N. D.
30	163,9 ± 9,9 (7)***	29,3 ± 3,0 (4)	19,4 ± 1,4 (4)***	N. D.
90	316,8 ± 12,5 (4)***	45,9 ± 3,4 (4)*	27,8 ± 2,8 (4)	3,1 ± 0,4 (4)

Tabla 33.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos durante el desarrollo en el hipocampo de la rata. Cada valor, expresado en ng/g tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D.= no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).



Edad en días	DA	3-MT	DOPAC	HVA
0	16,0 ± 1,2 (6)	N. D.	5,4 ± 0,7 (4)	27,9 ± 1,1 (6)
8	17,4 ± 1,1 (6)	7,9 ± 0,7 (4)	20,9 ± 0,6 (6)***	27,5 ± 1,4 (4)
15	18,7 ± 2,1 (10)	8,3 ± 0,7 (4)	19,2 ± 1,1 (10)	16,1 ± 1,6 (4)**
30	21,0 ± 1,2 (7)	8,0 ± 0,6 (6)	20,6 ± 1,3 (5)	14,5 ± 0,8 (5)
90	24,3 ± 3,5 (4)	10,9 ± 0,6 (4)*	13,8 ± 1,6 (4)*	16,7 ± 2,8 (4)

Tabla 34.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos durante el desarrollo en el hipocampo de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. N.D. = no detectado. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

En los primeros días de vida de la rata, el DOPAC y el HVA se comportaron de una forma diferente. Mientras en el primero se produjo un aumento estadísticamente significativo desde los 0 a los 8 días (287,0%,  $P < 0,001$ ), en el segundo se produjo una disminución desde los 8 a los 15 días (41,4%,  $P < 0,01$ ). Sin embargo, en el resto de los estadios del desarrollo estos dos compuestos permanecieron sin cambios significativos, a excepción del DOPAC que a los 90 días sufrió una disminución de su concentración (33,0%,  $P < 0,05$ ) (tabla 34).

#### 3.4.2. Envejecimiento. -

Lo más destacado de este periodo de la rata en el hipocampo es la falta de cambios de todas las aminas biógenas y metabolitos durante los primeros estadios. A los 24 meses se produce una disminución en la concentración de NMN, 3-MT y 5-HT (Tablas 35, 36 y 37).

Como puede verse en la tabla 35, en el triptófano se aprecia una disminución estadísticamente significativa a los 6 meses (16,8%,  $P < 0,01$ ), permaneciendo estable hasta los 30 meses.

La 5-HT experimenta cambios estadísticamente significativos a los 12 (33,8%,  $P < 0,05$ , una subida), 24 (47,8%,  $P < 0,01$ , una subida) y 30 meses (30,1%,  $P < 0,001$ , una bajada).

Sus metabolitos (5-HTP, 5-HIAA y 5-Htriptofol) permanecen sin cambios significativos, siendo muy bajas y parecidas las concentraciones del primero y del tercero.

En la tabla 36 se pueden ver los datos de NA en el hipocampo durante el envejecimiento. Tanto la NA como el MHPG no sufren cambios significativos durante este periodo de la vida de la rata y la razón MHPG/NA permanece casi inalterable a partir de los 6 meses.

Edad en meses	Trip	5-HTP	5-HT	5-HIAA	5-Htriptofol
3	3100,4 ± 69,2 (4)	6,0 ± 0,9 (4)	264,5 ± 10,7 (4)	318,3 ± 34,6 (4)	10,1 ± 1,1 (4)
6	2454,1 ± 126,8 (5)**	4,7 ± 0,5 (4)	259,1 ± 4,9 (4)	285,2 ± 27,6 (4)	8,3 ± 0,6 (4)
12	2284,5 ± 127,6 (4)	3,6 ± 0,3 (4)	346,7 ± 22,8 (4)*	319,8 ± 24,2 (4)	10,0 ± 0,5 (4)
24	2528,6 ± 47,9 (4)	5,1 ± 0,7 (4)	512,5 ± 9,1 (4)**	369,0 ± 4,6 (4)	9,1 ± 1,1 (4)
30	2425,5 ± 67,3 (4)	6,0 ± 1,1 (4)	358,1 ± 15,9 (4)***	379,5 ± 9,0 (4)	7,4 ± 1,2 (4)

Tabla 35.- Estudio de la concentración de serotonina y sus metabolitos durante el envejecimiento en el hipocampo de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

Edad en meses	NA	MHPG	NMN	MN
3	316,8 ± 12,5 (4)	45,9 ± 3,4 (4)	27,8 ± 2,8 (4)	3,1 ± 0,4 (4)
6	283,5 ± 11,7 (6)	47,4 ± 2,1 (4)	24,4 ± 0,7 (4)	6,4 ± 0,6 (4)**
12	290,8 ± 6,9 (4)	53,8 ± 4,1 (4)	27,6 ± 2,1 (4)	8,9 ± 0,6 (4)*
24	306,6 ± 10,3 (4)	56,8 ± 5,0 (4)	30,0 ± 1,1 (4)	8,1 ± 0,9 (4)
30	324,5 ± 13,0 (4)	64,3 ± 6,1 (4)	20,8 ± 1,4 (4)**	7,6 ± 1,0 (4)

Tabla 36.- Estudio de la concentración de noradrenalina y sus metabolitos durante el envejecimiento en el hipocampo de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

La NMN sufre una disminución estadísticamente significativa desde los 24 a los 30 meses (30,7%,  $P < 0,01$ ). La MN, que posee la más baja concentración, experimenta un aumento a los 6 meses (106,4%,  $P < 0,01$ ) y una disminución después de esta edad (39,1%,  $P < 0,05$ ).

Hemos observado que la DA tiene el mismo comportamiento que la anterior catecolamina (Tabla 37). Tanto ella como su principal metabolito, HVA, no experimentan cambios significativos durante el envejecimiento y su razón se mantiene bastante estable.

El 3-MT sólo tiene una disminución significativa entre los 24 y los 30 meses (53,4%,  $P < 0,05$ ) y, por último, el DOPAC, con una bajada estadísticamente significativa entre los 6 y los 12 meses (38,1%,  $P < 0,001$ ).

Edad en meses	DA	3-MT	DOPAC	HVA
3	24,3 ± 3,5 (4)	10,9 ± 0,6 (4)	13,8 ± 1,6 (4)	16,7 ± 2,8 (4)
6	19,5 ± 1,0 (5)	10,3 ± 1,1 (4)	15,5 ± 0,6 (5)	21,5 ± 2,0 (6)
12	19,8 ± 0,4 (4)	7,1 ± 0,3 (4)	9,6 ± 0,7 (4)***	15,6 ± 3,5 (4)
24	20,3 ± 1,8 (4)	8,8 ± 0,8 (4)	10,7 ± 1,2 (4)	16,3 ± 1,9 (4)
30	20,6 ± 3,6 (4)	4,1 ± 0,9 (4)*	12,9 ± 0,7 (4)	17,6 ± 1,3 (4)

Tabla 37.- Estudio de la concentración de dopamina y sus metabolitos durante el envejecimiento en el hipocampo de la rata. Cada valor, expresado en ng/g de tejido húmedo, indica la media ± el error estándar. El número de animales se indica entre paréntesis. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001, comparado con el valor anterior (test t de Student).

#### 4. DISCUSION. -

##### 4.1. Via visual. -

##### 4.1.1. Serotonina. -

Nuestros resultados muestran que en la vía visual existe una elevada concentración de triptófano. El triptófano está involucrado en la producción de 5-HT (Fernstrom y Wurtman, 1971; Fernstrom y Wurtman, 1972; Wurtman et al., 1981), pero, al mismo tiempo, la producción de 5-HT también podría estar regulada por la enzima triptófano hidroxilasa.

En las diferentes edades, los cambios de triptófano en el cerebro pueden estar relacionados con su concentración en la sangre. Como puede verse en las tablas 1, 2, 5, 8 y 11, las concentraciones de este aminoácido disminuyen hasta el día 15 en todas ellas. El índice de correlación entre su concentración a diferentes edades en el cerebro y en la sangre varía entre  $r=+0,7378$  para el tálamo posterior y  $r=+0,9029$  para el colículo superior. Lo que parece indicar que existe una correlación entre el triptófano en estas estructuras cerebrales y la sangre.

Esta disminución de sus niveles puede ser debido a varios factores; uno de ellos podría ser la alimentación, pues está bien establecido que los niveles de triptófano son sensibles a la dieta (Wurtman, 1983). A pesar de ello, nuestros resultados parecen indicar que tales cambios no pueden ser atribuidos exclusivamente a cambios en la alimentación, puesto que desde que las ratas nacen hasta los 21 días, en que son destetadas, son siempre alimentadas con el mismo tipo de alimento (la leche materna) y, al mismo tiempo, como hemos mencionado anteriormente, desde los 0 a

los 15 días la concentración de triptófano sufre una disminución estadísticamente significativa. A partir del día 21 las ratas tienen un cambio drástico en su alimentación al dejar de tomar leche y comenzar a comer pienso y, sin embargo, su concentración no sufre grandes modificaciones desde los 15 a los 30 días.

Otro factor a tener en cuenta puede ser el consumo de triptófano, se sabe que es mayoritariamente metabolizado por el hígado por medio de la enzima triptófano pirrolasa para producir vitamina B. Esta enzima está inducida durante el primer mes de vida de la rata (Roper y Franz, 1977). La inducción de esta vía metabólica podría producir la disminución de los niveles de triptófano en sangre, de los cuales, sólo un 3% pasa al cerebro (Van Praag y Lemus, 1983), lo que también podría producir la disminución de este aminoácido en el cerebro.

La síntesis de 5-HT puede ser regulada por: a) la concentración de triptófano y b) la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa. El índice de correlación triptófano-5-HT varía desde  $r=-0,270$  para el tálamo posterior hasta  $r=-0,824$  para la corteza visual, lo que sugiere que, al menos durante el desarrollo, para las estructuras estudiadas, no existe correlación y el índice es negativo ya que la 5-HT aumenta al mismo tiempo que el triptófano disminuye.

Nuestros resultados apoyan la idea de que la síntesis de 5-HT pueda ser regulada por la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa, y que el aumento de sus niveles pueda ser debido a un incremento de la actividad de dicha enzima, que se ha sugerido actúa como paso limitante de esta ruta (Lovenberg et al, 1968; Kaufman, 1974). Al mismo tiempo, la baja concentración de 5-HTP encontrada en todas las estructuras puede ser debida a la alta actividad de la enzima 5-HTP descarboxilasa detectada en todos los tejidos



estudiados (Ichiyama et al., 1968) y/o a la baja actividad de la propia triptófano hidroxilasa.

Si tenemos en cuenta que no se han encontrado cuerpos neuronales serotoninérgicos en las estructuras visuales (Lidov et al., 1980; Steinbusch, 1981), podemos asumir que la 5-HT puede venir a partir de fibras aferentes serotoninérgicas desde los núcleos del rafe al geniculado lateral (Azmitia y Segal, 1978; Steinbusch, 1981; Cropper et al., 1984), al colículo superior (Parent et al., 1981; Steinbusch 1981), al tálamo posterior (Rodrigo-Angulo y Reinoso-Suárez, 1982; Steinbusch, 1981) y a la corteza visual (Lidov et al., 1980; Steinbusch, 1981; Parnavelas y McDonal, 1983).

Nuestros resultados muestran que en todas las estructuras del sistema visual se produce un aumento de los niveles de 5-HT durante el desarrollo postnatal. Este perfil de desarrollo está de acuerdo con datos publicados anteriormente (Cano y Reinoso-Suárez, 1982), pero la falta de acuerdo en las cantidades de 5-HT puede ser debido a diferencias en la técnica empleada o al uso de diferentes tipos de ratas. Sin embargo, está claro que en ambos estudios esta indolamina aumenta durante este periodo.

La 5-HT alcanza su nivel adulto a distintas edades según el centro que se considere. En la corteza visual lo alcanza a los 8 días, en el tálamo posterior a los 3 meses y en las otras dos estructuras visuales a los 6 meses. Esto parece indicar que la fibras de 5-HT llegan a lugares alejados (por ejemplo, corteza visual) mucho antes de que las fibras entren en lugares más caudales en el diencefalo (p.e., tálamo posterior) o en el tectum (p.e., colículo superior). Todo lo expuesto anteriormente está de acuerdo con la idea de que existe una secuencia precisa de inervación de las futuras áreas de células blanco en relación inversa a la distancia de éstas con las células

serotoninérgicas. Este sistema de rutas prioritarias puede asignar un papel a los axones serotoninérgicos en la maduración de poblaciones específicas de células (Lauder y Krebs, 1976; Lauder y Krebs, 1978) o puede reflejar los cambios de lugar ocurridos a las diferentes estructuras cerebrales durante la evolución, de forma que zonas que al principio estaban más cerca de los centros de las células serotoninérgicas, pueden haber pasado a lugares más lejanos y viceversa, pero conservando la misma secuencia de inervación serotoninérgica (Wallace y Lauder, 1983). Lidov y Molliver (1982) han señalado que en el establecimiento de arborizaciones terminales existe una selectividad temporal dependiente del estado de maduración de las áreas que van a ser inervadas.

El periodo que comprende las dos primeras semanas de vida de la rata es muy importante para las estructuras visuales, al coincidir el final de este periodo con la apertura de los ojos. Por lo tanto, el geniculado lateral no recibe ninguna información procedente de la retina hasta el doceavo día después del nacimiento (Weidman y Kuwabara, 1968). Se han descrito otros fenómenos en relación con el desarrollo del geniculado lateral antes de la apertura de los ojos: un notable aumento en la complejidad de las dendritas (Parnavelas et al., 1977), aumento de vesículas (Karlsson, 1967) y un aumento del ADN total del cerebro (Winick, 1974). Todas estas observaciones son ejemplos de la gran actividad metabólica que ocurre en el geniculado lateral en esta edad.

El colículo superior posee los más altos niveles de 5-HT de estas cuatro estructuras. Este centro, en animales como la rata donde la influencia geniculoestriada es bastante escasa, juega un papel importante en la información visual, puesto que la ablación del colículo superior produce cambios dramáticos en el comportamiento controlado por la

visión (Dean y Redgrave, 1984). El sistema geniculoestriado de la rata puede utilizar el colículo superior como una estación de salida de información. Por ejemplo, existen proyecciones directas desde las áreas de la corteza visual estriada y extraestriada al colículo superior (Olavarria y Torrealba, 1978; Lent, 1982).

En las ratas recién nacidas, los niveles de 5-HIAA son mayores que los de 5-HT y la razón 5-HT/5-HIAA es más baja en la primera edad estudiada, especialmente en el geniculado lateral, donde sólo es mayor que la unidad después de los seis meses. Estos resultados sugieren que en estadios tempranos hay una mayor actividad de la monoamino oxidasa intraneuronal (Nachmias, 1960; Karki et al., 1962; Kurzepa y Bojanek, 1965). Al mismo tiempo, en el primer estadio estudiado podría haber una baja disponibilidad de 5-HT almacenada de manera que esto conduciría a una más rápida degradación de las aminas biógenas sintetizadas en animales jóvenes que en adultos.

Aunque el 5-Htriptofol aparece en estas estructuras en concentraciones muy bajas, estas cantidades podrían tener alguna actividad fisiológica como ha sido indicado por varios autores. Por ejemplo, su administración parece que induce sueño en los animales de experimentación (Feldstein et al., 1970).

El envejecimiento no parece tener un efecto uniforme en las diferentes estructuras estudiadas. En este caso la variabilidad podría estar relacionada con diferencias entre las regiones ensayadas. Nosotros hemos encontrado un aumento de triptófano durante el envejecimiento que puede ser explicado por el hecho de que hay un aumento de los compuestos solubilizados debido a una disminución del agua (Cahn y Borzeix, 1984). Durante el envejecimiento, al igual que durante el desarrollo, hemos encontrado muy bajas concentraciones de 5-HTP, lo cual nos indica que esto podría

ser debido a la alta actividad de la enzima 5-HTP descarboxilasa, junto con la baja actividad de la triptófano hidroxilasa que sería el paso limitante de la producción de 5-HT.

En nuestros datos hemos detectado cambios estadísticamente significativos en los niveles de 5-HT en las dos estructuras más directamente involucradas en la visión (geniculado lateral y corteza visual), pero estos cambios son opuestos, la primera sufre un aumento y la segunda una disminución. Sin embargo, el colículo superior y el tálamo posterior muestran una estabilización en los niveles de 5-HT con el envejecimiento. Todavía no son comprendidos los factores que originan un aumento regional específico de 5-HT, una disminución o una estabilización. Las pérdidas en los índices de neurotransmisores pueden reflejar una pérdida de neuronas o una reducción en el número de sinapsis y/o déficit bioquímicos. Se han publicado diferencias regionales en la pérdida de neuronas en ratas viejas (Peng y Lee, 1979). Sin embargo, no se han visto pérdidas de neuronas en la corteza visual (Peters et al., 1983). Los aumentos o disminuciones de los niveles de 5-HT con la edad podrían reflejar simplemente un aumento o una disminución en los niveles de triptófano o en la actividad triptófano hidroxilasa o una disminución o un aumento de la actividad monoamino oxidasa, respectivamente.

Nuestros resultados parecen indicar que la síntesis de 5-HT es independiente de los niveles de triptófano, durante el envejecimiento de estas estructuras los niveles de triptófano aumentan, mientras que los niveles de 5-HT sufren un aumento (geniculado lateral), una disminución (corteza visual) o no varían (colículo superior y tálamo posterior). Sin embargo, Meek et al. (1977) han encontrado una disminución tanto en los niveles de 5-HT como en la actividad de la triptófano hidroxilasa de los núcleos del

tronco cerebral. Reis et al. (1977) encontraron que la actividad triptófano hidroxilasa no cambiaba con la edad en el núcleo del rafe. Timiras et al. (1984) han indicado que la actividad regional de la triptófano hidroxilasa y MAO-A no varían con la edad.

Las fibras serotoninérgicas hacen sinapsis con distintas clases de neuronas dependiendo del núcleo. La actividad de un tipo neuronal dado puede disminuir significativamente con la edad en una área cerebral mientras que puede no ser afectado en otras áreas. Esto podría ser la causa de las diferencias en los niveles de 5-HT encontradas en las estructuras cerebrales estudiadas.

La concentración del 5-HIAA refleja más exactamente el turnover de 5-HT. Por consiguiente, nuestros resultados parecen indicar que en el colículo superior y en el tálamo posterior no hay cambios ni en la síntesis ni en el turnover de 5-HT, puesto que la 5-HT y el 5-HIAA no cambian durante el envejecimiento. Sin embargo, en el geniculado lateral se observa un aumento en su síntesis sugerido por el incremento de 5-HT, aparte de que su metabolismo no cambia ya que la razón 5-HT/5-HIAA se mantiene sin cambios. En la corteza visual la variación de la concentración de 5-HT y el mantenimiento de la razón 5-HT/5-HIAA sugiere que existe una disminución en la síntesis de 5-HT y que no se produjeron cambios significativos en el turnover durante el envejecimiento.

Será necesario disponer de más información para determinar la importancia de los cambios de estos neurotransmisores en el envejecimiento y el grado de control que puede ser desarrollado e impuesto por su manipulación.

#### 4.1.2. Catecolaminas. -

Nuestros resultados muestran que la concentración de NA durante el desarrollo en el sistema visual es un proceso postnatal, ya que partiendo de bajos niveles en el recién nacido, llega a tener a los 6 meses en el colículo superior, tálamo posterior, geniculado lateral y corteza visual, alrededor de 12, 18, 3 y 6 veces más concentración respectivamente. Esto está de acuerdo con trabajos previos, los cuales han reportado que la NA endógena se incrementa continuamente hacia el estado adulto desde niveles muy bajos al nacimiento (Jonsson y Kasamatsu, 1983; Shirokawa y Kasamatsu, 1986).

El aumento en el contenido de NA en el cerebro hasta el nivel adulto durante las primeras semanas de vida ocurre concomitantemente con la maduración morfológica de las neuronas noradrenérgicas (Loizou, 1972). También la distribución regional de catecolaminas en el cerebro del recién nacido se correlaciona estrechamente con la actividad de las enzimas biosintéticas (Coyle y Axelrod, 1972a; Coyle y Axelrod, 1972b; Lamprecht y Coyle, 1972). Por lo que el nivel adulto, teniendo en cuenta los niveles de NA, se alcanza a distintas edades según la estructura visual que consideremos. Así, el colículo superior y el geniculado lateral lo alcanzan a los 3 meses, la corteza visual a los 6 meses y el tálamo posterior tiene una subida de su concentración durante toda la vida de la rata. Esto sugiere que las regiones cercanas a los cuerpos celulares de las neuronas noradrenérgicas parecen desarrollar su inervación noradrenérgica más rápidamente que las regiones que están más distantes (Coyle y Henry, 1973). Sin embargo, desde el punto de vista morfológico, aunque el geniculado lateral comienza su maduración antes que la corteza cerebral (Niimi,

1962; Angevine, 1970), el estado adulto del geniculado lateral no se alcanza antes que el de la corteza visual.

Nosotros encontramos un aumento de NA en la corteza visual durante el periodo crítico (desde la apertura de los ojos hasta los 3 meses). El número de neuronas normalmente decrece como resultado de la experiencia visual (Pettigrew, 1974). Esto puede originar un aumento de terminales noradrenérgicas o un aumento de la actividad noradrenérgica, pues se ha reportado (Kasamatsu et al., 1979) que la NA actúa como un neuromodulador controlando la plasticidad y que destruyendo las terminales noradrenérgicas previene los cambios plásticos que normalmente resultan de la deprivación monocular.

El tálamo posterior es la estructura visual con la más alta concentración de esta catecolamina, pudiendo ser debido a una mayor inervación noradrenérgica a partir del locus coeruleus. Levitt y Moore (1978) han indicado que el tálamo dorsal y el neocortex son las dos áreas normalmente más inervadas por axones del locus coeruleus.

La proporción de tirosina en el cerebro puede alterar la proporción de síntesis de catecolaminas (Wurtman y Fernström, 1976). En nuestros resultados la concentración de triptófano sufre una disminución durante los primeros días del desarrollo, lo cual puede sugerir un aumento de la síntesis de catecolaminas, puesto que este aminoácido puede competir con la tirosina por su captación en el SNC.

Unido al aumento de NA hay una subida de los niveles de sus metabolitos (MHPG y NMN), por lo que hay un aumento del metabolismo de esta catecolamina. Las mayores concentraciones encontradas corresponden al MHPG del tálamo posterior, que coinciden con la máxima concentración de NA en esta estructura.

También podemos observar que en todas las estructuras hay diferencias significativas de MHPG y NMN en el periodo

crítico. Tienen un aumento de su concentración que está correlacionado con el de la NA.

La NMN es producida por la acción de la catecolamina-O-metil transferasa a partir de NA. Esta enzima está especialmente localizada en las células gliales o en la superficie de elementos dendríticos postsinápticos (McGeer y McGeer, 1981). Por lo que el aumento de NMN puede sugerir que hay un incremento de la liberación de NA.

La DA es la amina biógena encontrada en la más baja concentración en todas las estructuras visuales, alcanzando su nivel adulto a edades muy tempranas y, con excepción del colículo, apenas tiene cambios significativos en su concentración. Estudios de comportamiento sugieren que las sinapsis funcionales dopaminérgicas están desarrolladas en el cerebro de la rata recién nacida (Fibiger et al., 1970; McGeer et al., 1971b) y las futuras vías dopaminérgicas están más desarrolladas que las que contienen NA o 5-HT (Loizou, 1972). Además, estudios del efecto de inhibidores de la tirosina hidroxilasa y dopamina β-hidroxilasa indican que las neuronas catecolaminérgicas pueden ser fisiológicamente activas a edades tan tempranas como los 18 días de gestación (Coyle y Henry, 1973), puesto que las neuronas centrales catecolaminérgicas intervienen en importantes funciones, incluyendo el control del movimiento (Sourkes et al., 1969), modulación de la liberación de ciertas hormonas pituitarias (Wurtman, 1971) y alteración de los estados afectivos (Schildkraut y Kety, 1967; Snyder, 1972), por lo que no sería sorprendente si estas neuronas han llegado a ser funcionales en estadios muy tempranas del desarrollo.

El colículo superior tiene en el recién nacido muy bajos niveles de DA y es la estructura visual en la que hemos observado los mayores cambios de esta catecolamina, con subidas significativas en todas las edades del



desarrollo estudiadas. Esto podría ser debido a que la capa IV de este centro visual recibe aferentes de una gran cantidad de estructuras, entre ellas la sustancia nigra la cual contiene gran cantidad de neuronas dopaminérgicas y éstas podrían seguir un desarrollo postnatal.

Ya que la concentración de NA claramente excede la de DA a partir de los 15 días, ésta podría ser considerada en algunos casos como un intermediario de la síntesis de NA (Kuhar et al., 1972), aunque no pueden ser excluidas terminales dopaminérgicas en estas estructuras visuales. De hecho, hay evidencias farmacológicas en el feto y en la rata recién nacida de que la DA y la NA están localizadas en poblaciones de neuronas diferentes (Loizou, 1972; Ungerstedt, 1971). Sin embargo, es improbable, sobre todo en los primeros estadios del desarrollo, que tales terminales dopaminérgicas puedan ser la fuente primaria de la alta concentración de DOPAC y HVA encontrada. Varios autores han mostrado que el porcentaje de formación de DOPAC en el locus coeruleus está bien correlacionado con la actividad noradrenérgica en dicho núcleo (Buda et al., 1983; Gonon et al., 1983), así como en los terminales de neuronas noradrenérgicas (Scatton et al., 1984).

Los cambios de concentración de DOPAC en las neuronas dopaminérgicas de ciertas estructuras cerebrales se ha sugerido que pueden ser usados como un indicador de alteraciones de la actividad de esas neuronas (Roth et al., 1976). Durante el desarrollo podemos indicar que hay un ligero aumento de la actividad neuronal, pero con escasas diferencias significativas en todos los estadios y en todas las estructuras estudiadas.

Los niveles de HVA pueden representar el metabolismo extraneuronal de la DA (Roffler-Tarlov et al., 1971). Nuestros resultados muestran que este metabolismo es más elevado en el geniculado lateral, seguido del tálamo

posterior con un aumento significativo a los 8 días y del colículo superior y corteza visual que tienen valores muy similares. Esta última estructura podría tener en el recién nacido un gran metabolismo extraneuronal.

El 3-MT refleja la liberación de DA (Wood et al., 1982) y este metabolito de la DA, excepto en la corteza visual, donde apenas hay diferencia entre el valor del recién nacido y el de 6 meses, tiene un ligero aumento de concentración que indica una baja liberación de esta catecolamina en el sistema visual.

A partir de nuestros resultados es evidente que los niveles de DOPAC, HVA y 3-MT son unos índices sensibles de la actividad de las neuronas dopaminérgicas.

La corteza visual tiene las más bajas concentraciones de catecolaminas del sistema visual, lo cual sugiere que las terminaciones catecolaminérgicas son menos abundantes en esta estructura.

Durante el envejecimiento no hemos observado grandes diferencias en la concentración de las catecolaminas.

Los niveles de NA prácticamente se mantienen estables, sólo sufren ligeras subidas en todas las estructuras del sistema visual, a excepción del tálamo posterior, donde a los 30 meses tiene 5 veces más cantidad que a los 3 meses.

Esta estabilidad de su concentración confirma la idea de que esta catecolamina es fundamental, principalmente, durante el periodo crítico para mantener la plasticidad, teniendo en ese periodo los mayores incrementos.

La falta de diferencias significativas en el MHPG y NMN indica que no hay grandes cambios en el metabolismo y liberación, respectivamente, de NA.

Sólo la vía visual extrageniculada muestra diferencias significativas en la concentración de DA, lo cual indica que esta vía tiene mayores cambios durante el envejecimiento en la síntesis de esta catecolamina.

Durante este periodo de la vida de la rata, el DOPAC sufre una disminución de su concentración en el geniculado lateral y corteza visual y un aumento en el colículo superior y tálamo posterior, sugiriendo que la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Roth et al., 1976) es distinta en las vías visuales geniculada y extrageniculada.

Los niveles de HVA sufren un ligero aumento o se mantienen estables, por lo que no se producen grandes cambios en el metabolismo extraneuronal de esta amina biógena (Roffler-Tarlov et al., 1971). Lo mismo podemos decir en lo que respecta a su liberación, apenas hemos observado diferencias significativas en la concentración de 3-MT.

#### 4.1.3. Bienucleación.-

El estímulo sensorial es un factor crucial para la formación y mantenimiento de la actividad funcional de centros sensoriales específicos. Estudios previos de sistemas visuales inmaduros (Lund y Lund, 1973, Schneider, 1970) han demostrado un marcado grado de plasticidad durante estadios tempranos.

Nuestros resultados muestran que la enucleación al nacimiento afecta el desarrollo de algunos neurotransmisores en las distintas áreas visuales. La mayor variación la encontramos en la 5-HT y su principal metabolito en el colículo superior.

La 5-HT parece ser uno de los neurotransmisores de la vía visual (Lauder et al., 1981). Está presente en los axones terminales del geniculado lateral (Tabecis y DiMaria, 1972; Yamamoto, 1974) y en el colículo superior (Straschill y Perwein, 1971) y está envuelta en la activación fisiológica del tectum. Se ha demostrado que una

estimulación visual causa un incremento en el turnover de 5-HT en el colículo superior (Fukui y Vogt, 1975).

Investigaciones bioquímicas han mostrado que los niveles de 5-HT en el colículo superior de rata son relativamente altos (Palkovits et al., 1974). La distribución de las fibras serotoninérgicas en esta estructura fue primeramente descrita por Fuxe (1965) mediante histofluorescencia. Recientemente se ha descrito la disposición de 5-HT en sus distintas capas, encontrándose que las terminales serotoninérgicas son más densas en el stratum griseum superficiale (SGS) que en las otras capas (Ueda et al., 1985). Este aumento de la serotonina encontrado por nosotros puede ser debido a:

1) Una acumulación de neurotransmisores en el sistema visual (Lai et al., 1978). No parece que nuestros resultados confirmen esto ya que junto con el aumento de 5-HT existe otro de su principal metabolito, 5-HIAA, sugiriendo un incremento del metabolismo.

2) Un incremento compensatorio de otras vías que proyectan al colículo superior. Trabajos previos han indicado que la extirpación de las fibras aferentes a regiones del SNC pueden causar este efecto (Raisman, 1969).

3) Es conocido que la corteza visual proyecta a las porciones bajas del SGS y al estratum opticum (Lund, 1969; Mathers, 1977) y que las neuronas corticotectales incrementan su influencia en la actividad metabólica después de la enucleación.

4) Lund y Lund (1971) han reportado que después de la enucleación en la rata adulta, algunos lugares postsinápticos vacantes del colículo superior son ocupados por otras fuentes, pero la descripción de las vesículas sinápticas sugieren que no son de origen cortical.

Desde un punto de vista ultraestructural, el SGS se caracteriza por la presencia de un gran número de sinapsis y

el componente presináptico es frecuentemente retiniano. El elemento más frecuente parece ser dendrítico el cual pertenece a una neurona intrínseca o posiblemente a un circuito local (Lund, 1969). La relación entre aferentes retinianas y las varicosidades originadas del rafe dorsal (Parent et al., 1981) requieren un estudio mayor. Biegon et al. (1982) han señalado que el SGS se caracteriza por una inusual clara correlación entre la densidad de 5-HT y la de 5-HT<sub>1</sub>. Segu et al. (1986) han reportado que existen dos poblaciones de 5-HT<sub>1</sub>, que coexisten en las capas visuales del colículo superior, una de las cuales está probablemente localizada en los axones retinianos, los cuales, por lo que conocemos, no son serotoninérgicos (Brecha, 1983). Estos autores concluyen que la 5-HT parece que ejerce un control presináptico en la transmisión retino-colicular.

El geniculado lateral también muestra un aumento de la 5-HT con la enucleación aunque a los 6 meses alcanza el valor normal. El que esta estructura muestre menos variaciones que el colículo superior puede ser debido a que las neuronas del rafe se desarrollan en el periodo embrionario (Lauder y Bloom, 1974) y antes que la neurogénesis en el sistema visual. En la rata recién nacida algunos axones de las células ganglionares no han alcanzado el disco óptico (Morest, 1970). Es probable que la inervación serotoninérgica se establezca en el geniculado lateral antes que la formación del estímulo desde los ojos y éste no sea muy afectado por la eliminación retiniana.

La pobreza de fibras retinianas no impide el desarrollo de las fibras tálamo-corticales y neuronas intrínsecas del geniculado lateral.

El análisis ultraestructural revela que los lugares sinápticos normalmente ocupados por axones ópticos (fig. A) llegan a ser inervados por grandes terminales con vesículas redondas y mitocondrias con matriz electrodensa (fig. B). La

formación de éstas no parece depender de la previa existencia de otras retinianas, ya que éstas fueron extirpadas al nacimiento. Estas terminales pueden tener su origen en neuronas corticales o axones colaterales recurrentes. Tanto la corteza visual como el tálamo posterior no muestran variaciones significativas de la 5-HT con la enucleación.

Todas las estructuras visuales que hemos estudiado, excepto la corteza visual, no muestran grandes variaciones de NA, sólo algunos estadios aislados. Aunque se ha reportado que la privación binocular aumenta los niveles de NA en la corteza visual y el colículo superior de perro (Fox et al., 1968).

En la corteza visual los animales enucleados presentaron una disminución de NA a los 15 y 30 días, para producirse después a los 3 y 6 meses un aumento significativo. Esta área visual recibe una serie de estímulos moduladores no específicos, más notablemente uno noradrenérgico desde el locus coeruleus, otro colinérgico desde el núcleo magnocelular y un tercero serotoninérgico del núcleo del rafe. El primer estímulo citado ejerce en la corteza visual un importante control sobre la plasticidad, es decir, sobre la capacidad de este centro de organizar su modelo de conectividad. Se ha reportado que después de su ablación existe una plasticidad en el colículo superior, un incremento de NA y que esto posiblemente refleje un aumento de las neuronas intrínsecas y aferentes no dañadas (Fosse y Opstad, 1986). Nosotros también encontramos un aumento de NA después de la extirpación de las fibras ópticas. Este incremento probablemente sirve para aumentar la actividad de las neuronas intrínsecas que quedan, como ha sido demostrado en el geniculado lateral (Rogowski y Aghajanian, 1980; Kayama et al., 1982; Sakaguchi et al., 1984).

Los niveles de DA también variaron en algunas estructuras de la vía visual con la enucleación. En la corteza visual y tálamo posterior se encontraron que los niveles disminuyeron, no mostrando apenas variación el geniculado lateral, mientras que en el colículo superior encontramos una subida en casi todos los estadios. Este aumento de DA después de la enucleación está de acuerdo con los trabajos de Himwich et al. (1966) que hallaron también un aumento, pero en colículo de conejo.

Nuestros trabajos parecen sugerir que la 5-HT juega un papel muy importante en las diferentes estructuras de la vía visual. Dentro de ellas es el colículo superior el que muestra los mayores cambios. En la rata tiene una gran importancia ya que existen trabajos que muestran que lesiones en la corteza estriada no producen un gran fallo visual (Goodale y Murrison, 1975; Midgley y Tees, 1981). Esto sugiere que esta estructura recibe información visual que no recibe la vía geniculo-estriada (existen evidencias anatómicas y electrofisiológicas que apoyan esto, aunque no está clara la naturaleza exacta de dicha información). Es esencial el colículo superior intacto para el funcionamiento normal del sistema geniculo-estriado. Todo esto muestra su importancia en la visión y la necesidad de realizar en el futuro un estudio más profundo.

#### 4.2. Núcleo caudo-putamen. -

El núcleo caudo-putamen de la rata posee una alta concentración de aminas biógenas, especialmente de DA y sus metabolitos.

Existe una gran controversia en lo que respecta al conocimiento del paso limitante de la síntesis de 5-HT. Esta indolamina puede ser regulada por: 1) la concentración del

triptófano, 2) la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa. Los resultados obtenidos muestran que durante el desarrollo la concentración de triptófano disminuye, mientras que la de 5-HT aumenta, lo cual indica que la concentración de triptófano no parece ser el paso limitante de la formación de esta indolamina.

La baja concentración de 5-HTP, que hemos encontrado, podría ser debida a la gran actividad de la enzima 5-HTP decarboxilasa (Ichiyama et al., 1968) junto con la baja actividad de la Triptófano hidroxilasa, enzima que se ha sugerido que es el paso limitante y regulador de la producción de 5-HT (Lovenberg et al., 1968; Kaufman, 1974).

La 5-HT encontrada en este núcleo no es producida en neuronas del núcleo caudo-putamen, sino que es sintetizada en las terminaciones serotoninérgicas que provienen del núcleo del rafe (Anden et al., 1966; Ungerstedt, 1971) y de la sustancia nigra (Streit, 1980; Steinbusch, 1981). La variación de su concentración puede, por lo tanto, representar la variación de su concentración en los núcleos donde es producida.

El perfil de desarrollo del 5-HIAA es muy similar al de la 5-HT y su concentración, excepto a los 15 días, siempre está por debajo de la de 5-HT. La razón 5-HT/5-HIAA disminuye durante el desarrollo. A partir de estos resultados se puede deducir que la actividad de la enzima MAO-A aumenta durante este periodo en el núcleo caudoputamen.

La concentración de NA que hemos detectado en el adulto está en el mismo rango que la recientemente hallada en el núcleo caudo-putamen de la rata por Kontur et al. (1984).

El origen de la NA encontrada por nosotros en este núcleo, podría ser debido a las neuronas dopaminérgicas procedentes de la sustancia nigra, puesto que la NA se produce por la acción de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa sobre la



DA, pudiendo ser su producción una vía secundaria en estas neuronas. A pesar de ello, algunos autores sugieren que la baja concentración de NA es independiente de la DA y que podría venir de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (Jones et al., 1977; O'Donohue et al., 1979). Estos investigadores concluyen que el haz noradrenérgico dorsal, que se origina en el locus coeruleus (A6), es la fuente de parte de la inervación noradrenérgica de los núcleos caudo-putamen y accumbens en la rata. Al mismo tiempo, muestran que las neuronas noradrenérgicas de los grupos caudales del locus coeruleus también proyectan, a través del haz ventral, al caudo-putamen. Todo lo cual ha sido confirmado por Ricardo y Koh (1978).

Al contrario de lo que sucede en otras estructuras cerebrales que hemos estudiado, la concentración de MHPG se mantiene, a partir de los 15 días, por encima de la de NA, siendo casi dos veces mayor que la última a los 3 meses, esto puede indicar que el núcleo caudo-putamen tiene un metabolismo distinto de esta catecolamina y que la mayor parte de ella se degrada hacia MHPG.

Las altas concentraciones de DA, que hemos hallado, en el animal adulto están de acuerdo con los datos existentes en la bibliografía (Pileblad et al., 1985). La DA desempeña un importante papel funcional en el núcleo caudo-putamen, pues variaciones, tanto un incremento (Bird et al., 1979) como una disminución (Hornykiewicz, 1976) están involucradas en disfunciones del SNC.

La DA no es producida en neuronas intrínsecas del núcleo caudo-putamen, sino en terminales dopaminérgicas de la sustancia nigra y del arco ventral tegmental de Tsai (Dahlström y Fuxe, 1964; Llamas y Reinoso-Suárez, 1969; Ungerstedt, 1971) y algunas podrían venir desde el rafe (Kellaret al., 1977; Jacobs et al., 1978; Szabo, 1980; Wiklund et al., 1982). Por lo que creemos que la variación

de la concentración de DA durante el desarrollo podría representar: 1) la variación de ésta en sustancia nigra y rafe, 2) cambios producidos durante la maduración de estas fibras dopaminérgicas, y 3) las distintas interacciones de DA con otros neurotransmisores.

La influencia de la sustancia nigra en los niveles de DA en este núcleo es conocida por los estudios realizados en la enfermedad de Parkinson donde existe una disminución de sus niveles debido a una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Goldstein et al., 1969; De Ajuriaguerra y Gauthier, 1971; Kopin, 1972).

La interacción entre neurotransmisores podría ser explicada por el hecho de que la liberación de DA desde terminales nigroestriadas en el núcleo caudo-putamen puede ser influenciada por distintos neurotransmisores y compuestos relacionados, aplicados al tejido estriado tanto 'in vivo' como 'in vitro' (Antelman y Caggiula, 1977; Chesselet et al., 1982; Geyer y Lee, 1984). Estas observaciones indican la existencia de estímulos presinápticos para controlar la liberación de DA y no sería sorprendente que su sistema de neurotransmisores interactúe extensamente uno con otro.

El aumento de DA y NA, que hemos encontrado, durante el desarrollo postnatal de esta estructura en la rata está de acuerdo con otros autores (Olson et al., 1972; Graybiel, 1984; Graybiel y Newman-Gage, 1985), quienes mostraron cambios durante el desarrollo de la rata por técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas.

Junto con el aumento de la concentración de DA, existe otro de sus principales metabolitos, DOPAC y HVA, especialmente en el primero, lo que nos hace pensar que durante el desarrollo se produce un incremento de la síntesis y del metabolismo de esta catecolamina, y que, en el cerebro, se degrada principalmente a través de la

producción de DOPAC. A pesar de ello, con estos dos compuestos no podemos llegar a conocer la liberación de DA. Wood et al. (1982) indicaron que la concentración de 3-MT en el núcleo caudo-putamen puede servir como un índice de su liberación. De acuerdo con este autor, podemos observar que existe un aumento en la liberación de DA durante el desarrollo postnatal, pues en la concentración de 3-MT se aprecia una subida estadísticamente significativa durante el desarrollo, llegando a tener a los 3 meses niveles muy similares a los del HVA, con un aumento de 20 veces con respecto al recién nacido.

Es bien conocida la importancia de la DA en los ganglios basales. Sin embargo, recientemente se ha planteado el papel que juegan otros transmisores como la 5-HT, puesto que pueden originarse disturbios motores en animales experimentales a partir de una modificación de la razón DA/5-HT. Efectos similares aparecen con un aumento relativo en DA o una disminución en 5-HT (Hassler y Bak, 1969). En nuestros resultados la razón DA/5-HT cambia durante el periodo de desarrollo, es alrededor de 5 en el recién nacido, en el día 8 sufre un aumento, alcanzando un valor de 14 y se mantiene hasta el adulto entre 11-18. La importancia fisiológica de estos cambios durante el desarrollo postnatal es desconocida.

Al contrario de lo que ocurre durante el desarrollo en esta estructura cerebral, las concentraciones de triptófano y 5-HT se mantienen bastante estables durante el envejecimiento, a excepción del periodo entre los 24 y 30 meses en el que el primero sufre un aumento y la segunda una disminución, confirmando la teoría de que el triptófano no es el paso limitante en la síntesis de 5-HT.

El 5-HIAA, a partir de los 12 meses, experimenta un aumento de su concentración que unido a la disminución de 5-HT entre los 24 y 30 meses, dan lugar a una bajada de la

razón 5-HT/5-HIAA, por lo que creemos que durante el envejecimiento debe de haber un incremento de la actividad MAO-A.

Es contradictoria la literatura acerca de las variaciones de 5-HT durante el envejecimiento. Robinson et al. (1972) publicaron un descenso pequeño pero estadísticamente significativo de 5-HT con la edad en el núcleo caudado. El mismo grupo (Nies et al., 1973), no encontró, más tarde, cambios en esta indolamina desde los 25 hasta más de los 70 años de edad.

Las variaciones de los metabolitos de NA durante el envejecimiento son opuestas a las que suceden en el desarrollo, con lo que se puede deducir que hay un cambio en la vía metabólica de NA. La disminución de NMN con el envejecimiento sugiere una bajada en la liberación de NA (McGeer y McGeer, 1981). El MHPG ha sido detectado en concentraciones superiores a las de NA y NMN, al igual que ocurre durante el desarrollo.

Nuestros resultados muestran que entre los 24 y 30 meses se produce una disminución en la concentración de DA, este cambio podría ser debido a un incremento de su metabolismo durante el envejecimiento, puesto que junto a ella encontramos un aumento de DOPAC, HVA y 3-MT, siendo en este último poco significativo, lo cual indica que existe una subida en la liberación de esta catecolamina (Wood et al., 1982). Están de acuerdo con los de otros autores que encontraron un descenso significativo en el contenido de DA con la edad en el caudado y putamen en humanos (Carlsson y Winbland, 1976), y una disminución del 25% en el neocortico de ratones de más de 28 meses de edad (Finch, 1975). Resultados similares han sido descritos por Joseph et al. (1978). Este aumento del metabolismo podría estar correlacionado con los datos de estudios previos llevados a cabo con pacientes poco afectados de Parkinson (Berheimer et

al., 1973) y con estudios experimentales en monos produciéndoles lesiones de la sustancia nigra, encontrando que en estos animales la concentración de DA del núcleo caudado cayó más marcadamente que la de HVA (Sharman et al., 1967). Todo esto llevó a sugerir a estos autores que cuando se pierden algunas neuronas dopaminérgicas, se produce un incremento compensatorio de la actividad de las otras supervivientes, de manera que la razón HVA/DA aumenta. Todo lo expuesto anteriormente confirma nuestros resultados, en los cuales la razón HVA/DA se incrementa con el envejecimiento siendo 0,076 a los 6 meses y 0,122 a los 30 meses de edad en la rata.

La razón DA/5-HT sufre una subida durante este periodo, produciéndose un incremento relativo de DA y una disminución de 5-HT, pudiendo tener consecuencias en los disturbios motores de animales experimentales (Hassler y Bak, 1969).

Estos hallazgos confirman la impresión general que emerge de la literatura de que los sistemas de NA están menos afectados por la edad que los sistemas de DA (McGeer y McGeer, 1981).

Todos estos resultados nos llevan a pensar que no son significativos los cambios durante el envejecimiento en los niveles de aminas biógenas en el núcleo caudo-putamen de la rata. Esto podría estar de acuerdo con trabajos recientes, que muestran pequeñas diferencias en el número de neuronas durante este periodo en algunas áreas del SNC, por ejemplo, el cuerpo geniculado (Satorre et al., 1985). Esta variación parece ser muy significativa en algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, pero no con un envejecimiento 'normal'. Sin embargo, a pesar de esta falta de cambios en los niveles de aminas biógenas, podría haber diferencias durante esta etapa de la vida de la rata en otros importantes parámetros relacionados con ellas y que actualmente estamos investigando, como por ejemplo,

proporción de recambio, capacidad de acción de los receptores, etc..

#### 4.3. Hipocampo. -

El hipocampo se ha identificado como una estructura cerebral crítica para la formación y mantenimiento de la memoria normal. En los procesos de memoria se ha indicado que las neuronas dopaminérgicas pueden tener una influencia moduladora (Taghzouti et al., 1986).

En nuestros resultados podemos observar que tanto la DA como sus metabolitos, DOPAC, HVA y 3-MT, no experimentan muchas modificaciones durante el desarrollo y el envejecimiento. Sin embargo, en los niveles de HVA existe una ligera disminución. Es de destacar que el contenido de DA en el recién nacido es muy similar al del adulto, lo cual parece sugerir que la inervación dopaminérgica está más desarrollada que la de NA y 5-HT. Aunque no es seguro concluir por el momento, que alguno de sus metabolitos refleje una variación en la actividad de las neuronas dopaminérgicas, se debe tener en cuenta que los niveles de 3-MT son considerados normalmente como un buen indicador de la liberación de DA (Wood et al., 1982) y cambios en los niveles de 3-MT, pero no en los de DOPAC y HVA, pueden indicar que se producen modificaciones en la actividad funcional de las neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, a partir de nuestros resultados, podemos señalar que la actividad dopaminérgica y la liberación de esta catecolamina en el hipocampo no tienen cambios destacables durante el desarrollo y el envejecimiento.

Nuestros resultados muestran que la 5-HT se incrementó durante el primer mes de vida y que la NA lo hizo hasta el día 90, lo cual parece indicar que, como en otras estructuras cerebrales (Loizou, 1972; Cano y Reinoso-Suárez,

1982), el desarrollo de estas dos aminas biogénas es fundamentalmente un suceso postnatal. Esta observación está de acuerdo con otro autor que ha indicado que en el hipocampo se produce un aumento de más del 250% de las uniones específicas de [<sup>3</sup>H]5-HT entre la primera semana y el tercer mes postnatal (Hamon et al., 1980).

Las monoaminas son inhibitoras en el hipocampo. Las proyecciones serotoninérgicas ascendentes provienen del núcleo medial y dorsal del rafe y desarrollan impulsos inhibitorios sobre todas sus regiones, especialmente, sobre las células piramidales de dicha estructura (Robinson, 1983).

La facilitación postetánica prolongada (LTP, del inglés: long-term potentiation) es inducida por neurotransmisores en el hipocampo (Collingridge, 1985), así, se ha sugerido que el 5-HT tiene un posible papel modulador sobre la LTP (Bliss et al., 1983) y que la NA controla la LTP mediante la modulación de la plasticidad neuronal (Stanton y Heinemann, 1986). Esta modulación de la LTP puede ser debida a cambios en la función sináptica del giro dentado y, en este aspecto, la 5-HT es más potente que la NA (Bliss et al., 1983). Parece ser que los sistemas inhibitorios juegan un papel importante previniendo que se produzca la LTP en los momentos en que no es requerida para que la frecuencia de activación sea más alta cuando sea necesaria.

La 5-HT experimentó una subida durante el envejecimiento, siendo ésta significativa desde los 12 a los 24 meses. No se comprende el significado de este aumento. Puede reflejar una disminución de la actividad de la MAO-A, aunque se ha publicado que la actividad del complejo enzimático 'monoamino oxidasa' puede aumentar con la edad (Finch, 1977).

La NA y su principal metabolito, MHPG, no han cambiado durante el envejecimiento. No obstante, recientemente se ha observado una pérdida significativa del metabolito noradrenérgico, 4-metoxi-3-hidroxifenilglicol, en un tipo de demencia, la enfermedad de Alzheimer (Perry y Perry, 1982), por lo que quizás los cambios en el metabolismo de la NA sólo sucedan en algunas enfermedades y no en un envejecimiento 'normal'.

Al mismo tiempo, estos cambios del metabolismo de la NA en el Alzheimer tienen que ser interpretados con mucho cuidado, puesto que se ha encontrado que en animales a los que se les ha producido daños en áreas cerebrales colinérgicas, éstas están inervadas por fibras noradrenérgicas (Crutcher y Davis, 1981). Recientemente, se ha publicado que la 5-HT aumenta la liberación de NA en el hipocampo (Feuerstein y Hertting, 1986). Estas observaciones sugieren que en el hipocampo existe una interacción entre los diferentes neurotransmisores. El estudio del metabolismo durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento es de gran interés debido a su alteración en algunas enfermedades.



## 5. CONCLUSIONES. -

1. Durante el desarrollo los niveles de triptófano disminuyen tanto en sangre como en las distintas estructuras cerebrales estudiadas, presentando en ambos casos un perfil de desarrollo similar.

2. La síntesis de serotonina está regulada por la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa, apoyando esta idea las bajas concentraciones de 5-hidroxitriptófano, así como las elevadas de triptófano.

3. La maduración de las terminales noradrenérgicas en el sistema visual es un proceso fundamentalmente postnatal, puesto que los niveles en el adulto son de 18 a 3 veces más altos que en el recién nacido en el tálamo posterior y geniculado lateral, respectivamente.

4. En la vía visual, el sistema dopaminérgico, al contrario que el noradrenérgico, está muy desarrollado en el recién nacido, teniendo un valor de dos veces menor que en el adulto, excepto en el colículo superior.

5. La bienucleación afecta principalmente el metabolismo de la serotonina en el colículo superior. Produciéndose un aumento de la concentración de serotonina y de ácido 5-hidroxiindolacético del 94,0% y 55,5% a los 30 y 137,0% y 51,0% a los 90 días, respectivamente.

6. El envejecimiento se caracteriza por los escasos cambios que se producen en los centros visuales, excepto un aumento de 5 veces la concentración de noradrenalina en el tálamo posterior. En muchos casos estas aminas biógenas y sus metabolitos sufren una disminución.

7. El análisis ultraestructural del geniculado lateral después de la enucleación revela que los espacios que ocupaban las terminales retinianas son sustituidos por terminales con vesículas redondas y mitocondrias con matriz electrodensa.

8. El núcleo caudo-putamen muestra bajos niveles de noradrenalina y un aumento en la síntesis y degradación de serotonina durante el desarrollo y una estabilización durante el envejecimiento. En el adulto, la dopamina es el neurotransmisor principal de esta estructura como lo indican

tanto su elevada concentración (7014,0 ng/g de tejido fresco) con respecto a la noradrenalina (54,0 ng/g) y serotonina (621,0 ng/g). Al contrario que en las otras estructuras estudiadas, el desarrollo de la dopamina es un acontecimiento postnatal, puesto que experimenta un aumento de 8 veces desde el nacimiento hasta los 3 meses.

9. En el hipocampo de la rata la inervación dopaminérgica está muy desarrollada en el recién nacido, pues su concentración es el 66,0% de la del adulto. Sin embargo, la noradrenalina y la serotonina aumentan durante el desarrollo: 10,0% la primera y 30,0% la segunda, con respecto al adulto.

## 6. BIBLIOGRAFIA. -

- Adrien, J., Buisseret, P., Fregnac, Y., Gary-Bobo, E., Imbert, M., Tassin, J-P. and Trotter, Y. (1982). Noradrénaline et plasticité du cortex visual du chaton: un réexamen. C. R. Acad. Sci. Paris 295, 745-750.
- Anden, N. E., Dahlström, A., Fuxe, K., Larsson, K., Olson, L. and Ungerstedt, U. (1966). Ascending monoamines neurons to the telencephalon and diencephalon. Acta Physiol. Scand. 67, 313-326.
- Angevine, J.B.Jr. (1970). Time of neuron origin in the diencephalon of the mouse. J. Comp. Neurol. 139, 129-188.
- Antelman, S. M. and Caggiula, A. R. (1977). Norepinephrine-dopamine interactions and behaviour: a new hypothesis of stress-related interactions between norepinephrine and dopamine is proposed. Science 195, 646-653.
- Azmitia, E.C. and Segal, M. (1978). An autorradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. J. Comp. Neurol. 179, 641-667.
- Azmitia, E.C. (1978). The serotonin-producing neurons of the midbrain median and dorsal raphe nuclei. En: Handbook of Psychopharmacology, vol. 9, pág. 233-314. Editores: L.L. Iversen, S.D. Iversen y S.H. Snyder, Plenum Press, New York.
- Bear, M.F., Clinton, R.J.Jr. and Haycock, D.A. (1983). Stability of 6-hydroxydopamine under minipump conditions. Soc. Neurosci. Abst. 9, 352:2.
- Bear, M.F. and Daniels, J.D. (1983). The plastic response to monocular deprivation persists in kitten visual cortex after chronic depletion of norepinephrine. J. Neurosci. 3, 407-416.
- Bear, M.F. and Singer, W. (1986). Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. Nature 320, 172-176.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. and Settelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndrome of Parkinson and Huntington: clinical, morphological and neurochemical correlations. J. Neurol. Sci. 20, 415-425.
- Biegon, A., Rainbow, T.C. and McEwen, B.S. (1982). Quantitative autoradiography of serotonin receptors in the rat brain. Brain Res. 242, 197-204.
- Bird, E.D., Spokes, E.G.S. and Iversen, L.L. (1979). Increased dopamine concentration in limbic areas of brain from patients dying with schizophrenia. Brain 102, 347-360.
- Bliss, T.V.P., Goddard, G.V. and Riives, M. (1983). Reduction of long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat following selective depletion of monoamines. J. Physiol. (London) 334, 475-491.
- Bloom F.E., Groppeti, A., Revuelta, A. and Costa, E. (1969). Lesions of

- central norepinephrine terminals with 6-OH-dopamine: biochemistry and fine structure. *Science* 166, 1284-1286.
- Blue, M.E. and Parnavelas, J.G. (1982). The effect of neonatal 6-hydroxydopamine treatment on synaptogenesis in the visual cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 205, 199-206
- Bowden, D.M. and Williams, D.D. (1984). Aging. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 28, 305-337.
- Brecha, N., Karten, H.J. and Laverack, C. (1979). Enkephalin containing amacrine cells in the avian retina: immuno-histochemical localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3010-3014.
- Brecha, N. (1983). Retinal neurotransmitters: histochemical and biochemical studies. En: *Chemical Neuroanatomy*, pág. 85-129. Editor: P.C. Emson, Raven Press, New York.
- Buda, M., De Simoni, G., Gonon, F. and Fujol, J.-F. (1983). Catecholamine metabolism in rat locus coeruleus as studied by in vivo differential pulse voltammetry. I. Nature and origing of contributors to the oxidation current at +0.1 V. *Brain Res.* 273, 197-206.
- Cahn, J. and Borzeix, M.G. (1984). Water, electrolytes contents of the brain and cerebral function in aged rats. *Monogr. Neural. Sci.* 11, 85-92.
- Calas, A., Bosler, O., Arluison, M. and Bouchaud, C. (1978). Serotonin as a neurohormone in circumventricular organs and supra-ependymal fibers. En: *Brain-Endocrine Interaction*, pág. 238-250. Editores: D.E. Scott, G.P. Kozlowski y A. Basel, Karger, Basel.
- Cano, J. and Reinoso-Suárez, F. (1982). Postnatal development in the serotonin content of brain visual structures. *Dev. Brain Res.* 5, 199-201.
- Cano, J., Machado, A. and Reinoso-Suárez, F. (1986). Morphological changes in the retina of ageing rats. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 5, 41-50.
- Carlsson, A. and Winbland, B. (1976). Influence of age and time interval death and autopsy on dopamine and 3-methoxytyramine levels in human basal ganglia. *J. Neural. Transm.* 38, 271-276.
- Collingridge, G.L. (1985). Long-term potentiation in the hippocampus: mechanisms of initiation and modulation by neurotransmitters. *Trends in Pharmacol. Sci.* 6, 407-411.
- Costa, E., Panula, P., Thompson, M.K. and Cheney, D.L. (1983). The transsynaptic regulation of the septal-hippocampal cholinergic neurons. *Life Sci.* 32, 165-179.
- Cotman, C.W. and Scheff, S.W. (1979). Synaptic growth in aged animals. En: *Physiology and cell biology of aging*, pág. 109-120. Editores: A. Cherlinka, C.E. Finch, N. Kharasch, T. Makinodan, F.L. Scott y B.L. Strehlbl, Raven Press, New York.
- Cowan, W.M. (1970). Anterograde and retrograde transneuronal

- degeneration in the central nervous system. En: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy, pág. 217-251. Editores: W.J.H. Nauta y S.O.E. Ebbsson, Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Coyle, J.T. and Axelrod, J. (1972a). Dopamine  $\beta$ -hydroxylase in rat brain: developmental characteristics. *J. Neurochem.* 19, 449-459.
- Coyle, J.T. and Axelrod, J. (1972b). Tyrosine hydroxylase in rat brain: developmental characteristics. *J. Neurochem.* 19, 1117-1123.
- Coyle, J.T. and Henry, D. (1973). Catecholamines in fetal and newborn rat brain. *J. Neurochem.* 21, 61-67.
- Cropper, E.C., Eisenman, J.C. and Azmitia, E.C. (1984). An immunocytochemical study of the serotonergic innervation of the thalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 224, 38-50.
- Crutcher, C.A. and Davis, J.N. (1981). Sympathetic noradrenergic sprouting in response to central cholinergic denervation. *Trends Neurosci.* 4, 70-72.
- Chan-Palay, V. (1976). Serotonin axons in the supra- and sub-ependymal plexus and in the leptomeninges: their roles in local alterations of cerebrospinal fluid and vasomotor activity. *Brain Res.* 102, 103-130.
- Cheifetz, S. and Warsh, J.J. (1980). Occurrence and distribution of 5-hydroxytryptophol in the rat. *J. Neurochem.* 34, 1093-1099.
- Chesselet, M.-F., Cheramy, A., Reisine, T., Lubetzki, C. and Glowinski, J. (1982). Presynaptic regulation of striatal dopamine release - *In vivo* and *in vitro* studies. *J. Physiol. (London)* 78, 420-425.
- Dahlström, A. and Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62, 1-55.
- Dahlström, A. and Häggendal, J. (1966). Some quantitative studies on the noradrenaline content in the cell bodies and terminals of a sympathetic adrenergic neuron system. *Acta Physiol. Scand.* 67, 271-277.
- Daw, N.W., Videen, T.O., Parkinson, D. and Rader, R.K. (1985). DSP-4 (n-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine) depletes noradrenaline in kitten visual cortex without altering the effects of monocular deprivation. *J. Neurosci.* 5, 1925-1933.
- De Ajuriaguerra, J. and Gauthier, G. (eds.) (1971). *Monoamines, noyaux gris centraux, et syndrome de Parkinson.* Geneva: Georg, and Paris: Mason.
- Dean, P. and Redgrave, P. (1984). The superior colliculus and visual neglect in rat and hamster. II. Possible mechanism. *Brain Res. Rev.* 8, 143-153.
- DiBussolo, J.M., Gant, J.R. and Kerber, J.D. (1983). Instrumental considerations in catecholamine analysis using liquid chromatography with electrochemical detection. *Chromatog. Newslett.* 11, 27-29.
- Esplugues, J. (1983). *Perspectivas terapéuticas con su fundamento*

- farmacológico. En: Neurotransmisores autacoides, pag. 116-141. 3ª Edición, Fundación García Muñoz.
- Feldstein, A., Chang, F.H. and Kucharski, J.M. (1970). Tryptophol, 5-hydroxytryptophol and 5-methoxytryptophol induce sleep in mice. *Life Sci.* 9, 323-329.
- Fernstrom, J.D. and Wurtman, R.J. (1971). Brain serotonin content physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science* 173, 149-152.
- Fernstrom, J.D. and Wurtman, R.J. (1972). Brain serotonin content physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 178, 414-416.
- Feuerstein, T.J. and Hertting, G. (1986). Serotonin (5-HT) enhances hippocampal noradrenaline (NA) release: evidence for facilitatory 5-HT receptors within the CNS. *Arch. Pharmacol.* 333, 191-197.
- Fibiger, H.C., Lytle, L.D. and Campbell, B.A. (1970). *J. Comp. Physiol. Psych.* 72, 384-389.
- Finch, C.E. (1975). Ageing and the regulation of hormones: a view in October 1874. En: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 61, supl. Explorations in Ageing, pag. 229-238. Editores: V.J. Cristofalo, J. Roberts y R.C. Adelman.
- Finch, C.E. (1976). The regulation of physiological changes during mammalian aging. *Q. Rev. Biol.* 51, 49-83
- Finch, C.E. (1977). Neuroendocrine and autonomic aspects of aging. En: *Handbook of the Biology of aging*, capítulo 11, pag. 262-280. Editores: C.E. Finch y L. Hayflick, Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Flicker, Ch. and Geyer, M.A. (1982). Behavior during hippocampal microinfusions: I. Norepinephrine and diversive exploration. *Brain Res. Rev.* 4, 79-103.
- Fonnun, F. and Storm-Mathisen, J. (1978). Localization of Gaba-ergic neurons in the CNS. En: *Handbook of Psychopharmacology*, vol. 9, pag. 357-391. Editores: L.L. Iversen, S.D. Iversen y S.H. Snyder, Plenum Press, New York.
- Fosse, V.M. and Opstad, P.K. (1986). Biochemical plasticity in the superior colliculus of adult rats after chronic visual cortex ablation. *Brain Res.* 372, 189-192.
- Fox, M.W., Inman, O. and Glisson, S. (1968). *Dev. Psychobiol.* 1, 48-54.
- Fukui, R. and Vogt, M. (1975). The effect of visual stimuli on the turnover of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the superior colliculus. *J. Physiol. (London)* 248, 39P-40P.
- Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. The distribution of monoamine terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 64, Supl. 247, 37-85.
- Gage, F.H., Thompson, R.G. and Valdes, J.J. (1978). Endogenous norepi-

- nephri-  
ne and serotonin within the hippocampal formation during the development and recovery from septal hyperactivity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9, 359-367.
- Gage, F.H. and Springer, J.E. (1981). Behavioral assessment of norepinephrine and serotonin function and interaction in the hippocampal formation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14, 815-821.
- Geyer, M.A. and Lee, E.H.Y. (1984). Effects of clonidine, piperoxane and locus coeruleus lesion on the serotonergic and dopaminergic system in raphe and caudate nucleus. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3399-3404.
- Golden, G.S. (1973). Prenatal development of the biogenic amines systems of the mouse brain. *Dev. Biol.* 33, 300-311.
- Goldstein, M., Anagnoste, B., Battista, A.F., Owen, W.S. and Nakatani, S. (1969). Studies of amines in the striatum in monkeys with nigral lesions. *J. Neurochem.* 16, 645.
- Gonon, F., Buda, M., De Simoni, G. and Pujol, J.-F. (1983). Catecholamine metabolism in the rat locus coeruleus as studied by in vivo differential pulse voltammetry. II. Pharmacological and behavioral study. *Brain Res.* 273, 207-216.
- Goodale, M.A. and Murrison, R.C.C. (1975). The effects of lesions of the superior colliculus on locomotor orientation and the orienting reflex in the rat. *Brain Res.* 88, 243-261.
- Graybiel, A.M. and Ragsdale, Jr.W. (1983). Biochemical anatomy of the striatum. En: *Chemical Neuroanatomy*, pág. 427-504. Editor: P.C. Emson, Raven Press, New York.
- Graybiel, A.M. (1984). Modular patterning in the development of the striatum. En: *Cortical Integration: Basic, Archicortical and Cortical Association Levels of Neural Integration*, vol. 11, pág. 223-235. Editores: F. Reinoso-Suárez y C. Ajmone-Marsan, IBRO Monograph Series.
- Graybiel, A.M. and Newman-Gage, M. (1985). The development relationship between dopamine island and early striosomal neuron clusters in the fetal cat striatum. *Soc. Neurosci. Abstracts* 11, 205.
- Guillery, R.W. (1974). On structural changes that can be produced experimentally in the mammalian visual pathways. En: *Essays on the Nervous System: a Festschrift for Prof. J.A. Young*, pág. 299-326. Editores: R. Bellairs y E.G. Gray, Clarendon Press, Oxford.
- Hallman, H. and Jonsson, G. (1984). Monoamine neurotransmitter metabolism in microencephalic rat brain after prenatal methylazoxymethanol treatment. *Brain Res. Bull.* 13, 383-389.
- Hamon, M., Nelson, D.L., Herbert, A. and Glowinski, J. (1980). Multiple receptors for serotonin in the rat brain. En: *Receptors for Neurotransmitters and Peptide Hormones*, pág. 223-233. Editores: G. Pepeu, M.J. Kuhar y S.J. Enna, Raven Press, New York.
- Hassler, R. and Bak, I.J. (1969). Unbalanced ratios of striatal dopamine and serotonin after experimental interruption of strionigral connections. En: *Third Symposium on Parkinson's disease*, pág. 29-37.



Editores: F.J. Gilligham e I.M.L. Ronaldson, Livingston, Edinburgh, London.

- Hayhow, W.R., Sefton, A. and Webb, C. (1962). Primary optic centers of the rat relation to the terminal distribution of the crossed and uncrossed optic nerve fibers. *J. Comp. Neurol.* 118, 295-322.
- Himwich, W., Davis, J.M. and Agrawal, H.C. (1966). En: *Recent Advances in Biological Psychiatry*, vol. 9, pág. 271-279. Editor: J. Wortis, Plenum Press, New York.
- Honza, R., Schumacher, H., Klauck, A., Grecksch, G. and Matthies, H. (1984). Effect of apomorphine on retention of a brightness discrimination in dopamine supersensitive rats. *Behav. Neural. Biol.* 41, 23-29.
- Hornykiewicz, O. (1966). Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 18, 925.
- Hornykiewicz, O. (1976). Neurohumoral interactions and basal function and dysfunction. En: *The Basal Ganglia*, pág. 269-280. Editor: M.D. Yahr, Raven Press, New York.
- Ichiyama, A., Nakamura, S., Nishizuka, Y. and Hayaishi, O. (1968). Tryptophan 5-hydroxylase in mammalian brain. En: *Advances in Pharmacology*, vol. 6A, pág. 5-17. Editores: S. Garattini y P.A. Shore, New York Academic.
- Ikarashi, Y., Sasahara, T. and Maruyana, Y. (1985). Postmortem changes in catecholamines, indoleamines and their metabolites in rat brain regions: prevention with 10-Kw microwave irradiation. *J. Neurochem.* 45, 935-939.
- Ishikawa, K., Ott, T. and McGaugh, J.L. (1982). Evidence for dopamine as a transmitter in dorsal hippocampus. *Brain Res.* 232, 222-226.
- Jacobs, B.L., Foote, S.L. and Bloom, F.E. (1978). Differential projections of neurons within the dorsal raphe nucleus of the rat: a horseradish peroxidase (HRP) study. *Brain Res.* 147, 149-153.
- Jarrot, B. and Iversen, L.L. (1971). Noradrenaline metabolizing enzymes in normal and sympathetically denervated vas deferens. *J. Neurochem.* 18, 1.
- Jones, B.E., Halaris, A.E., McIljany, M. and Moore, R.Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res.* 127, 1-21.
- Jonsson, G. and Kasamatsu, T. (1983). Maturation of monoamine neurotransmitters and receptor in cat occipital cortex during postnatal critical period. *Exp. Brain Res.* 50, 449-458.
- Joseph, J.A., Berger, R.E., Engel, B.T. and Roth, G.S. (1978). Age-related changes in the nigrostriatum: a behavioral and biochemical analysis. *J. Gerontology*, 33, 643-649.
- Kaplan, M.S. and Bell, D.H. (1983). Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent - Radioautography study of granulate cells in the hippocampus. *Exp. Brain Res.* 52, 1-5.
- Karki, N., Kuntzman, R. and Brodie, B.B. (1962). Storage, synthesis and

- metabolism of monoamines in the developing rat. *J. Neurochem.* 9, 53-58.
- Karlsson, V. (1967). Observations on the postnatal development of neural structures in the lateral geniculate nucleus of the rat by electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 17, 158-175.
- Karnowsky, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27, 137A.
- Karten, H.J. and Brecha, M. (1980). Localization of substance P immunoreactivity in amacrine cells of the retina. *Nature* 283, 87-88.
- Kasamatsu, T. and Pettigrew, J.D. (1976). Depletion of brain catecholamines: failure of ocular dominance shift after monocular occlusion in kittens. *Science* 194, 206-209.
- Kasamatsu, T. and Pettigrew, J.D. (1979). Preservation of binocularity after monocular deprivation in the striate cortex of kittens treated with 6-hydroxydopamine. *J. Comp. Neurol.* 185, 139-162.
- Kasamatsu, T., Pettigrew, J.D. and Ary, M. (1979). Restoration of visual cortical plasticity by local microperfusion of norepinephrine. *J. Comp. Neurol.* 185, 163-182.
- Kasamatsu, T., Pettigrew, J.D. and Ary, M. (1981). Cortical recovery from effects of monocular deprivation: acceleration with norepinephrine and suppression with 6-hydroxydopamine. *J. Neurophysiol.* 45, 254-266.
- Kaufman, S. (1974). Properties of pterin-dependent aromatic amino acid hydroxylases. En: *Aromatic Amino Acids in the Brain*, pág. 85-108. Editores: G.E.W. Wolstenholme y D.W. Fitzsimons, Elsevier, Amsterdam.
- Kayama, Y., Negi, T., Sugitani, M. and Iwama, K. (1982). Effects of locus coeruleus stimulation on neuronal activities of dorsal lateral geniculate nucleus and perigeniculate reticular nucleus of the rat. *Neurosci.* 7, 655-666.
- Kellar, K.J., Brown, P.A., Madrid, J., Bernstein, M., Vernikos-Danellis, J. and Mehler, W.R. (1977). Origins of serotonin of forebrain structures. *Exp. Neurol.* 56, 52-62.
- Kety, S.S. (1972). The possible role of the adrenergic system of the cortex in learning. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 50, 376-389.
- Kim, C., Campanelli, C. and Jhanna, J.M. (1983). Determination of picogram levels of brain catecholamines and indoles by simplified liquid chromatographic electrochemical detection method. *J. Chromatog.* 282, 151-159.
- Kontur, P., Dawson, R. and Monjan, A. (1984). Manipulation of mobile phase parameters for the HPLC separation of endogenous monoamines in the rat brain tissue. *J. Neurosci. Methods.* 11, 5-18.
- Kopin, I.J. (1972). *Neurotransmitters*. Vol. 50, Research Publications of the Association for Research in Nervous and Mental Diseases. New York A. R. N. M. D.
- Kuhar, M.J., Roth, R.H. and Aghajanian, G.K. (1972). Synthesis of

- catecholamines in locus coeruleus from  $^3\text{H}$ -tyrosine in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2280-2282.
- Kurzepa, S.T. and Bojanek, J. (1965). The 5-HT level and MAO activity in rat brain during development. *Biol. Neonate* 8, 216-221.
- Lai, H., Makous, W.L., Quock, R.M. and Horita, A. (1978). Visual deprivation affects serotonin levels in the visual system. *J. Neurochem.* 30, 1187-1189.
- Lamprecht, F. and Coyle, J.T. (1972). DOPA decarboxilase in the developing rat brain. *Brain Res.* 41, 503-506.
- Langer, S.Z. (1974). Selective metabolic pathways for noradrenaline in the peripheral and in the central nervous system. *Medical Biology* 52, 372-383.
- Lauder, J.M. and Bloom, F.E. (1974). Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* 155, 469-482.
- Lauder, J.M. and Krebs, H. (1976). Effects of p-chlorophenylalanine on time of neural origin during embryogenesis in the rat. *Brain Res.* 107, 638-644.
- Lauder, J.M. and Krebs, H. (1978). Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev. Neurosci.* 1, 15-30.
- Lauder, J.M., Krebs, H., Wallace, J.A. and Petrusz, P. (1981). Serotonin as a developmental signal: relationships between 5-HT neurons and dividing cells in developing rat brain. *Anat. Rec.* 199, 150A.
- Lent, R. (1982). The organization of subcortical projections of the hamster's visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 206, 227-242.
- Léranth, C., Maxwell, D.J. and Verhofstad, A.A.J. (1984). Ultrastructure of serotonin-immunoreactive boutons in the substantia gelatinosa of the rat's spinal cord. *J. Physiol. (London)* 355, 20P.
- Levitt, P. and Moore, R.Y. (1978). Noradrenaline neuron innervation of the neocortex in the rat brain. *Brain Res.* 139, 219-231.
- Lewis, P.R. and Shute, C.C.D. (1978). Cholinergic pathways in the CNS. En: *Handbook of Psychopharmacology*, vol. 9, pág. 315-347. Editores: L.L. Iversen, S.D. Iversen y S.H. Snyder, Plenum Press, New York.
- Lidov, H.G.W., Grzanna, R. and Molliver, M.E. (1980). The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat: an immunohistochemical analysis. *Neurosci.* 5, 207-227.
- Lidov, H.G.W. and Molliver, M.E. (1982). An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull.* 8, 389-430.
- Lindvall, O. and Björklund, A. (1978). Organization of catecholamine neurons in the cat central nervous system. En: *Handbook of Psychopharmacology*, vol. 9, pág. 139-222. Editores: L.L. Iversen, S.D. Iversen y S.H. Snyder, Plenum Press, New York.
- Loizou, L.A. (1972). The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat. *Brain Res.* 40, 395-418.

- Lovenberg, W., Jequier, E. and Sjoerdsma, A. (1968). Tryptophan hydroxylation in mammalian system. En: *Advances in Pharmacology*, vol. 6A, pág. 21-36. Editores: S. Garatini y P.A. Shore. New York Academic.
- Lund, R.D. (1969). Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 135, 179-208.
- Lund, R.D. and Lund, J.S. (1971). Synaptic adjustment after deafferentiation of the superior colliculus of the rat. *Science* 171, 804-807.
- Lund, R.D. and Lund, J.S. (1973). Reorganization of the retinotectal pathway in rats after neonatal retinal lesions. *Exp. Neurol.* 40, 377-390.
- Llamas, A. and Reinoso-Suárez, F. (1969). Projections of substantia nigra and ventral segmental mesencephalic area. En: *Third Symposium on Parkinson's disease*, pág. 82-87. Editores: F.J. Gilligham e I.M.L. Ronaldson, Livingston, Edinburgh, London.
- Mackay, A.V.P., Yates, C.M., Wright, A., Hamilton, P. and Davies, P. (1978). Regional distribution of monoamines and their metabolites in the human brain. *J. Neurochem.* 30, 841-848.
- Maruyana, Y. and Kusaka, M. (1979). Assay of norepinephrine and dopamine in the rat brain after microwave irradiation. *Life Sci.* 23, 1603-1608.
- Mathers, L.H. (1977). Retinal and cortical projections to the superior colliculus of the rabbit. *Exp. Neurol.* 57, 698-712.
- McGeer, E.G., Fibiger, H.C., McGeer P.L. and Wicson, V. (1971a). Aging and brain enzymes. *Exp. Gerontol.* 6, 391-396.
- McGeer, E.G., Fibiger, H.C. and Wickson, V. (1971b). Differential development of caudate enzymes in the neonatal rat. *Brain Res.* 32, 433-440.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G. and Suzuki, J.S. (1977) Aging and extra-pyramidal function. *Arch. Neurol.* 34, 33-35
- McGeer, P.L. and McGeer, E.Q. (1981). Neurotransmitter in the ageing brain. En: *The Molecular Basis of Neuropathology*, pág. 631-648. Editores: A.N. Davinson y R.H.S. Thompson, Edward Arnold Ltd., London.
- Meek, J.L., Bertilsson, F., Cheney, D.L., Zsilla, G. and Costa, E. (1977). Aging-induced changes in acetylcholine and serotonin content of discrete brain nuclei. *J. Gerontol.* 32, 129-131.
- Mefford, I.N., Gilberg, M. and Barchas, J.D. (1980). Simultaneous determination of catecholamines and unconjugated 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in brain tissue by ion-pairing reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Biochem.* 104, 469-472.
- Midgley, G.C. and Tees, R.C. (1981). Orientating behavior by rats with visual cortical and subcortical lesions. *Exp. Brain Res.* 41, 316-328.
- Moore, R.Y. (1975). Neurochemistry and endocrinology. En: *The Hippocampus*, vol. 1, Structure and Development, pág. 215-237. Editores: R.L. Isaacson y K.H. Pibram, Plenum Press, New York.

- Morest, D.K. (1970). The pattern of neurogenesis in the retina of the rat. *Z. Anat. Entwickl-Gesch.* 131, 45-67.
- Morrison, J.H., Foote, S.L., Molliver, M.E., Bloom, F.E. and Lidov, H.G.W. (1982). Noradrenergic and serotonergic fibers innervate complementary layers in monkey primary visual cortex: an immunohistochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2401-2405.
- Nachmias, V.T. (1960). Amine oxidase and 5-HT in developing rat brain. *J. Neurochem.* 6, 99-104.
- Nies, A., Robinson, D.S., Davis, J.M. and Ravaris, L. (1973). Changes in monoamine oxidase with aging. En: *Psychopharmacology with Aging*, pág. 41-54. Editores: C. Eisdorfer y W.E. Fann, Plenum Press, New York.
- Niimi, K. (1962). The ontogenic development of the diencephalon of the mouse. *Tokushima J. Exp. Med.* 8, 203-238.
- Nobin, A. and Björklund, A. (1975). Topography of monoamine neuron systems in the human brain as revealed in fetuses. *Acta Physiol. Scand. suppl.* 388, 1-40.
- O'Donohue, T.L., Crowley, W.R. and Jacobowitz, D.M. (1979). Biochemical mapping of noradrenergic ventral bundle projection sites: evidence for a noradrenergic-dopaminergic interaction. *Brain Res.* 172, 87-100.
- Olavarria, J. and Torrealba, F. (1978). The effect of acute lesions of the striate cortex on the retinotropic organization of the lateral peristriate cortex in the rat. *Brain Res.* 151, 386-391.
- Olson, L., Seiger, A. and Fuxe, K. (1972). Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: highly fluorescent islands in developing and adult rats. *Brain Res.* 44, 283-288.
- Palkovits, M., Brownstein, M. and Saavedra, J.M. (1974). Serotonin content of the brain stem nuclei in the rat. *Brain Res.* 80, 237-249.
- Parent, A. and Descarries, L., Beaudet, A. (1981). Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine. *Neurosci.* 6, 115-138.
- Parnavelas, J.G., Mounty, E.J., Bradford, R. and Lieberman, A.R. (1977). The postnatal development of neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 171, 481-500.
- Parnavelas, J.G. and McDonald, J.K. (1983). The cerebral cortex. En: *Chemical Neuroanatomy*, pág. 505-549. Editor: P.C. Emson, Raven Press, New York.
- Patel, A.J., Bendek, G., Balasz, R. and Lewis, P.D. (1977). Effect of reserpine on cell proliferation in the developing rat brain: a biochemical study. *Brain Res.* 129, 283-297.
- Peng, M.T. and Lee, L.R. (1979). Regional differences of neuron loss of rat brain in old age. *Gerontology* 25, 205-211.
- Perry, E.K. and Perry, R.H. (1982). Neurotransmitter and Neuropeptide systems in Alzheimer-Type dementia. En: *The Aging Brain, Physiological and Pathological Aspects*, *Exp. Brain Res.*, suppl. 5,

- pág. 140-145. Editor: S. Hoyer, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Peters, A., Feldman, M.L. and Vaughan, D.W. (1983). The effect of aging on the neuronal population within area 17 of adult rat cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* 4, 273-282.
- Pettigrew, J.D. (1974). *J. Physiol. (London)* 237, 49-74.
- Pettigrew, J.D. and Kasamatsu, T. (1978). Local perfusion of noradrenaline maintains visual cortical plasticity. *Nature* 271, 761-763.
- Pileblad, E. and Fornstedt, B., Clark, O., Carlsson, A. (1985). Acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine on dopamine metabolism in mouse and rat striatum. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 707-712.
- Plaznik A., Danysz, W. and Kostowski, W. (1983). Some behavioral effects of microinjections of noradrenaline and serotonin into the hippocampus of the rat. *Physiol. Behav.* 31, 625-631.
- Pradham, S.N. (1980). Central neurotransmitters and aging. *Life Sci.* 26, 1643-1656.
- Raisman, G. (1969). Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 14, 25-48.
- Reis, D.J., Ross, R.A. and Joh, T.H. (1977). Changes in the activity and amounts of enzymes synthesizing catecholamines and acetylcholine in brain, adrenal medulla, and sympathetic ganglia of aged rat and mouse. *Brain Res.* 136, 465-474.
- Rhoades, R.W. and Hess, A. (1983). Altered catecholaminergic innervation of superior colliculus after enucleation in adult and neonatal hamsters. *Brain Res.* 261, 353-357.
- Ricardo, J.A. and Koh, E.T. (1978). Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res.* 153, 1-26.
- Richards, J.G., Lorez, N.P. and Tranzer, J.P. (1973). Indolealkylamine nerve terminals in central ventricles: identification by electron microscopy and fluorescence histochemistry. *Brain Res.* 57, 277-288.
- Robinson, D.S., Nies, A., Davis, J.M., Bunney, W.E., Colburn, R.W., Bourne, H.R., Shaw, D.M. and Coppen, A.J. (1972). Aging monoamines and monoamine oxidase levels. *Lancet* 290-291.
- Robinson, S.E., Malthe-Sorensen, D., Wood, P.L. and Commissiong, J. (1979). Dopaminergic control of the septo-hippocampal cholinergic pathway. *J. Pharm. Exp. Ther.* 20, 476-479.
- Robinson, S.E. (1983). Effect of specific serotonergic lesions on cholinergic neurons in the hippocampus, cortex and striatum. *Life Sci.* 32, 345-353.
- Rodrigo-Angulo, M.L. and Reinoso-Suárez, F. (1982). Topographical organization of the brainstem to the lateral posterior-pulvinar thalamic complex in the cat. *Neurosci.* 7, 1495-1508.
- Roffler-Tarlov, S., Sharman, D.F. and Tegerdine, P. (1971). 3,4-

- dihydroxyphenylacetic acid and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in the mouse striatum: a reflection of intra- and extra-neuronal metabolism of dopamine. *J. Pharmacol.* 46, 409-415.
- Rogowski, M.A. and Aghajanian, G.K. (1980). Activation of lateral geniculate neurons by norepinephrine: mediation by an  $\alpha$ -adrenergic receptor. *Brain Res.* 182, 345-359.
- Roper, M.D. and Franz, J.M. (1977). Glucocorticoid control of the development of tryptophan oxygenase in the young rat. *J. Biol. Chem.* 252, 4354-4360.
- Roth, R.H., Murrin, L.C. and Walters, J.R. (1976). Central dopaminergic neurons: effects of alterations in impulse flow on the accumulation of dihydroxyphenylacetic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 36, 163-171.
- Roth, G.S. and Hess, G.D. (1982). Changes in the mechanism of hormone and neurotransmitter action during aging: current status of the role of receptor and post-receptor alterations: a review. *Mech. Ageing Dev.* 20, 175-194.
- Sakaguchi, R., Shirokawa, T. and Nakamura, S. (1984). Changes in projection from locus coeruleus to lateral geniculate nucleus following ablation of visual cortex in adult rats. *Brain Res.* 321, 319-322.
- Samorajski, T. and Rolsten, C. (1973). Age and differences in the chemical composition of brains of mice, monkeys and humans. *Progress in Brain Res.* 40, 253-265.
- Satorre, J., Cano, J. and Reinoso-Suárez, F. (1985). Stability of the neuronal population of the dorsal lateral geniculate nucleus (LGNd) of aged rats. *Brain Res.*, 339, 375-377.
- Scatton, B., Dennis, T. and Curet, D. (1984). Increase in dopamine and DOPAC levels in noradrenergic terminals after electrical stimulation of the ascending noradrenergic pathways. *Brain Res.* 298, 193-196.
- Schneider, G.E. (1970). Mechanisms of functional recovery following lesions of visual cortex or superior colliculus in neonatal and adult hamsters. *Brain Res. Evol.* 3, 295-323.
- Schildkraut, J.J. and Kety, S.S. (1967). Biogenic amines and emotion. *Science* 156, 21-30.
- Segal, M. (1976). Serotonergic antagonists in rat hippocampus. *Brain Res.* 103, 167-169.
- Segu, L., Abdelkefi, J., Dusticier, G. and Lanoir, J. (1986). High-affinity serotonin binding sites: autoradiographic evidence for their location on retinal afferents in the rat superior colliculus. *Brain Res.* 384, 205-217.
- Seiger, A. and Olson, I. (1971). Late prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Z. Anat. Entwickl.-gesch.* 140, 281-318.
- Sharman, D.F., Poirier, L.J., Murphy, Q.F. and Sourkes, T.L. (1967). Homovanillic acid and dihydroxyphenylacetic acid of the striatum of monkeys with brain lesions. *Canad. J. Physiol.*, 45, 57-62.
- Sharman, D.F. (1973). The catabolism of catecholamines. *Brit. Med. Bull.*

29, 110-115.

- Shirokawa, T. and Kasamatsu, T. (1986). Concentration-dependent suppression by  $\beta$ -adrenergic antagonist of the shift in ocular dominance following monocular deprivation in kitten visual cortex. *Neurosci.* 18, 1035-1046.
- Simpkins, J.W., Mueller, G.P., Huang, H.H. and Meites, J. (1977). Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinol.* 100, 1672-1678.
- Smith, D.E. (1977). The effects of deafferentiation on the development of brain and spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 8, 349-367.
- Snyder, S.H. (1972). *Archs. Gen. Psychiat.* 27, 169-179.
- Sourkes, T., Poirer, L. and Singh, S. (1969). In: *Third symposium on Parkinson's disease*, pag. 54-60. Editores: F.J. Gillingham e I.M. Ronaldson, Livingstone, Edinburgh, London.
- Sourkes, T.L. (1973). On the origin of homovanillic acid (HVA) in the cerebrospinal fluid. *J. Neural. Transm.* 34, 153.
- Stanton, P.K. and Heinemann, U. (1986). Norepinephrine (NE) enhances stimulus and excitatory amino acid evoked  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  fluxes in dentate granule cells. *Neurosci. Lett. Supl.* 26, S473.
- Steinbusch, H.W.M. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat: cell bodies and terminals. *Neurosci.* 6, 557-618.
- Steveni, U., Bjorklund, A. and Moore, R.Y. (1972). Growth of intact central adrenergic axons in the denervated lateral geniculate body. *Exp. Neurol.* 35, 290-299.
- Storm-Mathisen, J. (1977). Localization of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model. *Prog. Neurobiol.* 8, 119-181.
- Straschill, M. and Perwein, J. (1971). Effect of iontophoretically applied biogenic amines and cholinomimetic substances upon the activity of neurons in the superior colliculus and mesencephalic reticular formation of the cat. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 324, 43-55.
- Streit, P. (1980). Selective retrograde labeling indicating the transmitter of neuronal pathways. *J. Comp. Neurol.* 191, 429-463.
- Szabo, J. (1980). Distribution of striatal afferents from the mesencephalon in the cat. *Brain Res.* 188, 3-21.
- Tabecis, A.K. and DiMaria, A. (1972). A re-evaluation of the mode of action of 5-HT on lateral geniculate neurons: comparison with catecholamines and LSD. *Exp. Brain Res.* 14, 480-493.
- Taghzouti, K., Le Moal, M. and Simon, H. (1986). Dopaminergic innervation of the lateral septum and learning processes. *Neurosci. Lett. suppl.* 26, S332.
- Timiras, P.S. and Bignami, A. (1976). Pathophysiology of the aging



- brain. En: Special Review of Exp. Aging Research. Progress in Biology, pág. 351-378. Editores: M.F. Elias, B.E. Eleftherion y P.K. Elias, EAR, Ina., Bar Harbo.
- Timiras, P.S. (1978). Biological perspectives on aging: in search of a masterplan. *Ann. Sci.* 66, 605-613.
- Timiras, P.S., Segall, P.E. and Walker, R.F. (1979). Physiological aging in the central nervous system: perspectives on "interventive" gerontology. En: *Aging - its Chemistry. Proceeding of the Third Arnold O. Bukman Conference in Clinical Chemistry*, pág. 46-63. Editor: A.A. Dietz, American Association of Clinical Chemistry, Inc. Washington, D.C..
- Timiras, P.S., Hudson, D.B. and Segall, P.E. (1984). Lifetime brain serotonin: regional effects of age and precursor availability. *Neurobiol. Aging* 5, 235-242.
- Ueda, S., Ihara, N. and Sano, Y. (1985). The organization of serotonin fibers in the mammalian superior colliculus: an immunohistochemical study. *Anat. Embryol.* 173, 13-21.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 82, Supl. 367, 1-48.
- Van Praag, H.M. and Lemus, C. (1983). Monoamine precursors in the treatment of psychiatric disorders. En: *Nutrition and the Brain*, vol. 7, pág. 89-138. Editores: R.J. Wurtman y J.J. Wurtman, Raven Press, New York.
- Venable, J. and Coggeshall, R. (1965). The use of a simple lead citrate stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 25, 407A.
- Walker, R.F. and Timiras, P.S. (1981): Pacemaker insufficiency and the onset of aging. En: *Cellular Pacemaker II*, pág. 396-425. Editor: D. Carpenter, Wiley Interscience, New York.
- Wallace, J.A. and Lauder, J.M. (1983). Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* 10, 459-479.
- Weidman, T.A. and Kuwabara, T. (1968). Postnatal development of the rat retina: an electron microscopic study. *Arch. Ophthalmol.* 79, 470-484.
- Westerink, B.H.C. and Mulder, T.B.A. (1981). Determination of picomole amounts of dopamine, noradrenaline, 3,4-dihydroxyphenylalanine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, and 5-hydroxyindolacetic acid in nervous tissue after one-step purification on sephadex G-10, using high-performance liquid chromatography with a novel type of electrochemical detection. *J. Neurochem.* 36, 1449-1462.
- Westerink, B.H.C. (1983). Analysis of trace amounts of catecholamines and related compounds in brain tissue: a study near the detection limit of liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Liquid Chromatog.* 6, 2337-2351.
- Wiklund, L., Leger, L. and Persson, M. (1981). Monoamine Cell distribu-

- tion in the cat brainstem: A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. *J. Comp. Neurol.* 203, 613-648.
- Winick, M. (1974). Cellular growth during normal and abnormal development of the brain. En: *Biochemistry of the Developing Brain*, vol. 2, pág. 199-226. Editor: W. Himwich, M. Dekker Inc., New York.
- Wood, P.L., Nair, N.P.V. and Bozarth, W. (1982). Striatal 3-metoxityramine as an index of dopamine release: effects of electrical stimulation. *Neurosci. Lett.* 32, 291-294.
- Wurtman, R.J. (1961). *Neurosci. Res. Prog. Bull.* 9, 172-297.
- Wurtman, R.J. and Fernstrom, J.D. (1976). Control of brain neurotransmitter synthesis by precursor availability and nutritional state. *Biochem. Pharmacol.* 25, 1691.
- Wurtman, R.J., Hefti, F. and Melamed, E. (1981). Precursor control of neurotransmitter synthesis. *Pharmacol. Rev.* 32, 315-335.
- Wurtman, R.J. (1983). Nutrition: the changing scene. Behavioural effects of nutrients. *Lancet* 1145-1147.
- Yamamoto, C. (1974). *Exp. Brain Res.* 19, 271-281.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Martiano Santiago Pavón titulada, Estudio de la concentración de las Quinas biogénicas en distintas estructuras cerebrales durante el desarrollo, el envejecimiento y la disrupción visual. acordó otorgarle la calificación de Apto "Cum Laude"

Sevilla, 13 de Julio 1987

El Vocál,

B. Cabezas

El Presidente

Alonso

El Vocál,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Vocál,

[Signature]

El Doctorado,

[Signature]