

TD  
591

TD  
591

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,  
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

R. 9397



INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE EL METABOLISMO DE LAS MONOAMINAS EN LAS  
ESTRUCTURAS CEREBRALES DE LA VIA VISUAL DE LA RATA.

Tesis que presenta el Ldo.  
Antonio José Herrera Carmona  
para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas.

Sevilla, Julio de 1990.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,  
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

Tesis que presenta el Ldo. Antonio José Herrera Carmona para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en

de la

de esta Universidad desde el día

hasta el día

Fdo. Antonio José Herrera Carmona.

Sevilla de

de 19

EL DIRECTOR DE

  
Vº Bº del director de la tesis:

Fdo: Dra. Josefina Cano García.

Profesora Titular.

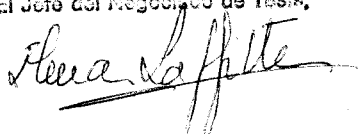
UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL



Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 106 número 21 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 20 de Julio 1970

El Jefe del Negociado de Tesis,



1. Introducción	1
1.1. Metabolismo de las monoaminas en el cerebro	2
1.1.1. Serotonina	2
1.1.2. Catecolaminas	10
1.2. Aspectos estructurales de la vía visual	18
1.3. Envejecimiento	22
1.4. Aspectos teóricos de las medidas de turnover	26
2. Material y métodos	28
2.1. Animales	28
2.2. Productos y reactivos	28
2.3. Aparatos	30
2.4. Medidas de aminas biógenas y sus metabolitos en el cerebro	31
2.5. Drogas	32
2.6. Medidas de actividades enzimáticas en el cerebro	33
2.6.1. Triptófano hidroxilasa	33
2.6.2. Tirosina hidroxilasa	33
2.6.3. MAO A y MAO B.	34
2.7. Medida de proteínas	35
2.8. Análisis estadístico	35
3. Resultados	36
3.1. Vía geniculada	37

3.1.1. Genuculado lateral	37
3.1.1.1. Actividad tirosina hidroxilasa	37
3.1.1.2. Actividad triptófano hidroxilasa	37
3.1.1.3. Actividades MAO A, MAO B y razón MAO A/MAO B	37
3.1.1.4. Tasa de acumulación de DA	43
3.1.1.5. Turnover de DOPAC	43
3.1.1.6. Tasa de acumulación de NA y NMN	43
3.1.1.7. Turnover de MHPG	44
3.1.1.8. Tasa de acumulación de 5-HTP	44
3.1.1.9. Tasa de acumulación de 5-HT	49
3.1.1.10. Turnover de 5-HIAA	49
3.1.1.11. Concentración de DA y DOPAC tras el tratamiento con NSD-1015	49
3.1.1.12. Concentración de NA y NMN tras el tratamiento con NSD-1015	50
3.1.1.13. Concentración de 5-HT y 5-HIAA tras el tratamiento con NSD-1015	50
3.1.2. Corteza visual	50
3.1.2.1. Actividad tirosina hidroxilasa	50
3.1.2.2. Actividad triptófano hidroxilasa	50
3.1.2.3. Actividades MAO A, MAO B y razón MAO A/MAO B	58
3.1.2.4. Tasa de acumulación de DA	58
3.1.2.5. Turnover de DOPAC	58
3.1.2.6. Tasa de acumulación de NA y NMN	59
3.1.2.7. Turnover de MHPG	59

3.1.2.8. Tasa de acumulación de 5-HTP	62
3.1.2.9. Tasa de acumulación de 5-HT	62
3.1.2.10. Turnover de 5-HIAA	62
3.1.2.11. Concentración de DA y DOPAC tras el tratamiento con NSD-1015	63
3.1.2.12. Concentración de NA y NMN tras el tratamiento con NSD-1015	63
3.1.2.13. Concentración de 5-HT y 5-HIAA tras el tratamiento con NSD-1015	63
3.2. Vía extrageniculada	73
3.2.1. Colículo superior	73
3.2.1.1. Actividad tirosina hidroxilasa	73
3.2.1.2. Actividad triptófano hidroxilasa	73
3.2.1.3. Actividades MAO A, MAO B y razón MAO A/MAO B	73
3.2.1.4. Tasa de acumulación de DA	74
3.2.1.5. Turnover de DOPAC	74
3.2.1.6. Tasa de acumulación de NA y NMN	74
3.2.1.7. Turnover de MHPG	75
3.2.1.8. Tasa de acumulación de 5-HTP	75
3.2.1.9. Tasa de acumulación de 5-HT	79
3.2.1.10. Turnover de 5-HIAA	79
3.2.1.11. Concentración de DA y DOPAC tras el tratamiento con NSD-1015	80
3.2.1.12. Concentración de NA y NMN tras el tratamiento con NSD-1015	80

3.2.1.13. Concentración de 5-HT y 5-HIAA tras el tratamiento con NSD-1015	80
3.2.2. Tálamo posterior	89
3.2.2.1. Actividad tirosina hidroxilasa	89
3.2.1.2. Actividad triptófano hidroxilasa	89
3.2.2.3. Actividades MAO A, MAO B y razón MAO A/MAO B	89
3.2.2.4. Tasa de acumulación de DA	90
3.2.2.5. Turnover de DOPAC	90
3.2.2.6. Tasa de acumulación de NA y NMN	90
3.2.2.7. Turnover de MHPG	93
3.2.2.8. Tasa de acumulación de 5-HTP	93
3.2.2.9. Tasa de acumulación de 5-HT	93
3.2.2.10. Turnover de 5-HIAA	94
3.2.2.11. Concentración de DA y DOPAC tras el tratamiento con NSD-1015	94
3.2.2.12. Concentración de NA y NMN tras el tratamiento con NSD-1015	95
3.2.2.13. Concentración de 5-HT y 5-HIAA tras el tratamiento con NSD-1015	95
4. Discusión	105
4.1. Actividades enzimáticas	106
4.1.1. Triptófano hidroxilasa	106
4.1.2. Tirosina hidroxilasa	106
4.1.3. Monoamino oxidasa	107
4.2. Turnover de aminas biógenas	110
4.2.1. Vía geniculada	110

4.2.2. Vía extrageniculada	119
4.2.2.1. Colículo superior	119
4.2.2.2. Tálamo posterior	123
4.3. Efectos del tratamiento con NSD-1015 sobre las monoaminas	126
5. Conclusiones	129
6. Bibliografía	133

## **1 . INTRODUCCION**



## 1.1. METABOLISMO DE LAS MONOAMINAS EN EL CEREBRO

### 1.1.1. SEROTONINA

Las monoaminas procedentes de la descarboxilación de aminoácidos aromáticos constituyen un grupo de sustancias de gran importancia dentro del sistema nervioso, estando implicadas en diferentes funciones cerebrales sobre las que parecen ejercer un control neurohumoral más que actuar como auténticos neurotransmisores. Las monoaminas de mayor interés dentro del sistema nervioso central son la serotonina (5-HT), la dopamina (DA) y la noradrenalina (NA).

Los comienzos de los trabajos sobre la serotonina son ya lejanos, remontándose a un periodo en el que no se relacionaba a esta sustancia con el sistema nervioso. Inicialmente, hubo dos corrientes de investigación que precedieron al aislamiento de la serotonina. La primera era el estudio de ciertas sustancias que aparecían en la sangre después de la coagulación, identificándose a las plaquetas como el origen de las mismas (O'Connor, 1912; Freund, 1920; Gaddum, 1936). Esta línea de investigación condujo finalmente al aislamiento de la serotonina pura, y su caracterización bioquímica como 5-hidroxitriptamina (5-HT)(Page, 1954).

La segunda línea de investigación procedió de los estudios histológicos de la células existentes en el endotelio del tracto gastrointestinal de mamíferos, células descritas como enterocromafines. En estas células se aisló una sustancia a la que se llamó enteramina (Ersparmer, 1966; Vialli, 1966). La enteramina fue pronto identificada como 5-hidroxitriptamina.

Aunque la serotonina se identificó en los tejidos animales en 1949 (Rapport, 1949), no fue hasta 1953 cuando Twarog y Page señalaron su

existencia en el cerebro de mamíferos. Poco después empezó a considerarse la existencia de neuronas serotoninérgicas (Welsh, 1957). Esta idea se vio reforzada por varios estudios farmacológicos (Gaddum, 1953; Pletscher y col., 1955; Marshall y col., 1960). La observación de que la serotonina mostraba efectos antagónicos con el LSD a nivel del útero de rata (Fingl y Gaddum, 1953), y el conocimiento de que la administración de LSD creaba un estado mental similar a la esquizofrenia, hizo pensar que la serotonina podía tener un papel específico en las funciones cerebrales (Gaddum, 1954). Sin embargo, la prueba más convincente de que la serotonina podía actuar como sustancia transmisora vino del estudio de invertebrados (Welsh, 1953; Twarog, 1954; Welsh, 1957).

La serotonina parece estar implicada en diversas funciones cerebrales. Así, pronto se sugirió que actuaba en el control del ciclo vigilia-sueño (Jouvet y Delorme, 1965; Jouvet, 1967); en la regulación de la temperatura corporal (Chase y Murphy, 1973); en el control de los patrones de comportamiento, especialmente los relacionados con la agresividad (Sheard, 1969; Di Chiari y col., 1971) y la sexualidad (Hoyland y col., 1970); en la percepción del dolor (Tenen, 1967; Samanin y col., 1970); en el control de funciones neuroendocrinas tales como la liberación de hormona luteinizante (Schneider y McCann, 1970) o en la de hormona adrenocorticotrópica (Krieger y Krieger, 1970; Azmitia y col., 1970). Finalmente, los niveles cerebrales de serotonina se ven alterados en patologías tales como la fenilcetonuria (Jequier, 1968), el síndrome de Down (Boullin and O'Brien, 1971), la migraña (Curzon y col., 1966; Anthony, 1968), o el Parkinson (Poirer y col., 1966; Johansson y Roose, 1967) por citar algunas de las más

relevantes.

Los primeros trabajos sobre la serotonina realizados en el cerebro de mamíferos demostraron que esta sustancia estaba desigualmente distribuida (Amin y col., 1954; Bogdanski y col., 1957). El primer mapa de cuerpos celulares serotoninérgicos se debe a Dahlstrom y Fuxe (1964). Estos autores describieron la existencia de nueve grupos de cuerpos celulares, numerados B1 a B9, la mayoría de los cuales estaban dentro de los llamados "núcleos del rafe".

La serotonina se forma a partir del triptófano en una reacción de dos pasos en la cual este aminoácido es convertido en L-hidroxitriptófano (5-HTP) por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH; EC 1.14.16.4). El 5-hidroxitriptófano es descarboxilado hasta 5-hidroxitriptamina (serotonina) por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (EC 4.1.1.28). La degradación de la serotonina se produce por la acción de la enzima monoamino oxidasa A (Yang y Neff, 1974)(MAO A; EC 1.4.3.4), que cataliza su desaminación hasta 5-hidroxiindolacetaldehído (5-HIA). Posteriormente, la aldehído deshidrogenasa cataliza la formación de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), el metabolito principal de la serotonina. El 5-HIAA se elimina por conjugación. La serotonina tiene una vía de degradación secundaria a partir del 5-HIA, que se metaboliza hasta 5-hidroxitriptofol (5-HTOH) por acción de la enzima aldehído reductasa. La figura 1 muestra un esquema de esta vía metabólica.

La reacción inicial de hidroxilación utiliza dos sustratos, L-triptófano (L-TRP) y oxígeno molecular, así como un factor pterínico reducido, que se cree es L-eritrotetrahidrobiopterina. En esta reacción, un átomo de oxígeno molecular se utiliza en la 5-hidroxilación del triptófano mientras que el otro es reducido hasta agua. Los elec-

trones son donados por el cofactor tetrahidrobiopterínico, y la dihidrobiopterina quinoide inestable que se forma es inmediatamente regenerada a la forma tetrahidrobiopterínica por la dihidropteridina reductasa (Kaufman, 1974; Kaufman and Fisher, 1974; Kaufman, 1977a). Por cada mol de tetrahidrobiopterina que se oxida, se forma un mol de 5-hidroxitriptófano, que finalmente será convertido en 5-hidroxitriptamina.

La L- $\alpha$ -aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC; EC 4.1.1.22) es una enzima piridoxal-5'-fosfato dependiente que se encuentra en las neuronas serotoninérgicas, donde transforma 5-hidroxitriptófano en 5-hidroxitriptamina, y en las catecolaminérgicas, donde el paso catalizado es la transformación de 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) en dopamina (Sourkes, 1977). Sin embargo, se requieren unas condiciones muy diferentes de pH, concentración de sustrato y de cofactor para la actividad óptima de cada una de estas dos reacciones (Sims y col., 1973). El 5-hidroxitriptófano es el sustrato que se descarboxila preferentemente en la neurona serotoninérgica ya que la afinidad de la enzima por este aminoácido es al menos dos órdenes de magnitud mayor que la que posee por el triptófano (Ichiyama y col., 1970). La actividad aminoácido aromático descarboxilasa está presente en los extractos de cerebro en mayor cantidad que la actividad triptófano hidroxilasa (Ichiyama y col., 1968). Esta es la razón por la que se considera a la reacción de hidroxilación como el paso limitante de la síntesis de serotonina. El hecho de que el 5-hidroxitriptófano sólo se encuentre en el cerebro en trazas (Tappaz y Pujol, 1980), indica que esta sustancia se descarboxila rápidamente, lo que también sugiere que sea la hidroxilación del triptófano el paso limitante en la forma-

ción de serotonina.

La monoamino oxidasa (MAO; EC 1.4.3.4) es una enzima flavín dependiente de amplia distribución en los tejidos de mamíferos. Se distinguen dos tipos de actividad MAO, llamadas A y B. La enzima se distribuye heterogéneamente en el cerebro. Se asume que la MAO A es intraneuronal y que la MAO B es glial (Jarrot e Iversen, 1971; Yu, 1986). La serotonina parece ser catalizada por la MAO A (Yang y Neff, 1974; Yu, 1986).

La realización de un estudio profundo sobre la regulación de esta ruta se ve dificultado por la extrema labilidad de la triptófano hidroxilasa y por la pequeña actividad que exhibe. Además, la actividad hidroxilasa que se obtiene tras la preparación de sobrenadantes de baja velocidad, se ve alterada por una diversidad de factores que incluyen fosfolípidos, detergentes, tripsina y condiciones del medio fosforilantes. Estos problemas pueden soslayarse en parte mediante el empleo de técnicas que permiten la medida de la formación de serotonina in vivo. Estas técnicas consisten fundamentalmente en a) la medida de la acumulación de serotonina a lo largo del tiempo tras el uso de una sustancia bloqueante de su degradación; b) la medida de la acumulación de 5-hidroxitriptófano tras el uso de un agente bloqueante de su descarboxilación hasta serotonina y c) el uso de triptófano marcado radioactivamente, lo cual permite seguir la dinámica de un pulso de este aminoácido previamente administrado. Los dos primeros métodos implican la aplicación de drogas que pueden tener efectos no deseados en principio. Por ejemplo, el uso de ciertos inhibidores de la actividad monoamino oxidasa incrementa los niveles cerebrales de triptófano y perturba algunos procesos que son objeto de estudio. La estimación de la tasa de síntesis de serotonina mediante el uso de estos compues-

tos debe realizarse en periodos de tiempo cortos tras la administración de estas drogas. Por otra parte, la acumulación de serotonina puede afectar a la síntesis de nuevas moléculas de esta amina, lo que conduciría a una estimación falsa de su tasa de síntesis, al menos en algunas áreas cerebrales (Carlsson y Lindqvist, 1973; Tappaz y Pujol, 1980). Los inhibidores de descarboxilasa que se emplean en los estudios in vivo, producen una pequeña elevación de los niveles de triptófano en cerebro (Carlsson y Lindqvist, 1973), y pueden inhibir a otras enzimas que se encuentran implicadas en el metabolismo de aminoácidos (Wurtman, 1974). Además, la acumulación de 5-HTP que se produciría tras el bloqueo de la descarboxilasa podría llegar a inhibir la actividad triptófano hidroxilasa, deteniéndose la síntesis de nuevas moléculas de 5-HTP. Sin embargo Carlsson (1974), observó que la acumulación de 5-HTP tras el bloqueo de la descarboxilasa es lineal durante 45 minutos, y que el 5-HTP no se pierde por difusión durante este tiempo. Por otra parte, el empleo de triptófano marcado radioactivamente tiene algunos inconvenientes in vivo; el método resulta caro debido a la alta actividad específica requerida en los ensayos. Por otra parte las variaciones regionales en la concentración de triptófano endógeno (Neckers y col., 1977) hacen preciso un ajuste de la actividad específica en cada una de las áreas cerebrales objeto de estudio.

Un hecho que llama la atención de la síntesis de la serotonina es la baja tasa de conversión de triptófano a 5-hidroxitriptófano in vivo en comparación con la actividad triptófano hidroxilasa que se registra in vitro en condiciones saturantes de sustrato y cofactor. Esta diferencia es superior a los dos órdenes de magnitud en el rafe dorsal

(Meek y Neckers, 1975; Meek y Lofstrandh, 1976), lo cual indica que en las neuronas serotoninérgicas la actividad triptófano hidroxilasa está fuertemente restringida. Los factores responsables de la regulación de la actividad triptófano hidroxilasa *in vivo* no se conocen completamente, aunque algunos ya han sido identificados. Por ejemplo, se sabe que los niveles de triptófano en el cerebro no son saturantes para la triptófano hidroxilasa (Boadle-Biber, 1982), y esto presumiblemente tiene un papel importante en la determinación de la tasa de síntesis de la serotonina *in vivo*. Por otra parte, no se conoce hasta que punto las concentraciones de oxígeno o de cofactor controlan la síntesis de serotonina, pero esto puede ser igualmente de considerable importancia. Es posible que las propiedades cinéticas de la triptófano hidroxilasa puedan modularse *in vivo*, lo que proporcionaría un mecanismo muy rápido y sensible para el control de la tasa de síntesis de serotonina en presencia de concentraciones limitantes de sustrato y cofactor.

La serotonina se almacena principalmente en vesículas sinápticas donde es protegida de la deaminación catalizada por la monoamino oxidasa. La observación de que la serotonina se libera mediante un mecanismo de exocitosis requiere la existencia de una forma de almacenamiento en vesículas. Sin embargo, se ha observado una cierta heterogeneidad en los compartimentos intraneuronales de serotonina. Así, se ha observado que la serotonina recién sintetizada es preferentemente liberada durante la despolarización, lo que sugiere la existencia de un gran compartimento intraneuronal de serotonina que es relativamente estable y poco utilizable para su liberación (Shields y Eccleston, 1973; Elks, y col., 1979b). En la identificación de estos dos compartimentos se han utilizado varios términos, siendo quizás los

más comunes los de "funcional" y "de reserva", referidos al pequeño y de rápida liberación, y al grande y relativamente estable, respectivamente. Se ha sugerido también la existencia de un almacén extravesicular soluble de serotonina, aunque se acepta de forma general que toda si no la mayor parte de la serotonina intraneuronal se encuentra en forma vesiculada.

### 1.1.2. CATECOLAMINAS

El término catecolaminas se refiere genéricamente a los compuestos orgánicos que contienen un grupo catecol (un anillo benceno con dos sustituyentes hidroxilo adyacentes) y un grupo amino. En la práctica, el término catecolaminas hace referencia a la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. Los primeros estudios fisiológicos sobre la acción de las catecolaminas se remontan hasta el año 1899, cuando Lewandowsky observó que la administración de adrenalina imitaba los efectos de la estimulación del sistema simpático, sugiriendo que era esta sustancia o alguno de sus precursores la que se liberaba cuando este sistema era estimulado. La dopamina fue la primera de estas sustancias sintetizada artificialmente (Barger y Ewins, 1910) en un esfuerzo por relacionar la estructura química con los efectos fisiológicos de estos compuestos parecidos a la adrenalina. Posteriormente se sintetizó el precursor de la dopamina, la 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA)(Funk, 1911), sugiriéndose que la adrenalina se formaba in vivo a partir de este aminoácido.

Las pruebas definitivas de la transmisión química fueron obtenidas por Loewi (1921, 1922). Este autor demostró la liberación de una sustancia cardioinhibidora tras la estimulación del nervio vago, y de



una sustancia excitadora (simpática) tras la estimulación del simpático. Más tarde se observó la liberación por parte de fibras postganglionares simpáticas de una sustancia parecida a la adrenalina (Cannon y Rosenblueth, 1937). Bacq (1934, 1938) consideró a la noradrenalina como uno de los posibles candidatos para actuar como transmisor en los nervios postganglionares simpáticos. Esta hipótesis fue posteriormente demostrada (Euler, 1946; Bacq y Fischer, 1947; Euler, 1948). La desigual distribución de la noradrenalina dentro del cerebro (Vogt, 1954) apoyó la idea de que esta sustancia podría actuar como neurotransmisor en el sistema nervioso central.

La presencia de la dopamina en el cerebro fue discutida por Montagu (1957) y Weil-Malherbe y Bone (1957), y definitivamente demostrada por Carlsson y Waldeck (1958). Diferentes trabajos llevaron a la conclusión de que la dopamina podía estar actuando como neurotransmisor en el sistema nervioso central, independientemente de su papel como precursor de la noradrenalina (Carlsson y Waldeck, 1958; Bertler y Rosengren, 1959a,b).

La vía sintética de las catecolaminas, que en sus primeros pasos tiene una gran similitud con la de las indolaminas, comienza en el aminoácido tirosina. Inicialmente, la tirosina es transformada en (L-DOPA) por la acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH; EC 1.14.16.2). Posteriormente, la L-DOPA se descarboxila, transformándose en dopamina. Esta reacción de descarboxilación es catalizada por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa. La tirosina hidroxilasa requiere oxígeno molecular y un cofactor pterínico reducido, que es una tetrahidrobiopterina. En la reacción, uno de los átomos de oxígeno es utilizado en la hidroxilación de la tirosina, mientras que el otro es reducido hasta agua. Los electrones necesarios son donados por el

cofactor tetrahidrobiopterínico que se oxida, siendo inmediatamente regenerado hasta su forma reducida mediante una reacción catalizada por la dihidropteridina reductasa. Por cada mol de tetrahidrobiopterina que se oxida, se forma un mol de dihidroxifenilalanina, que será finalmente convertido en dopamina.

Las propiedades catalíticas de la tirosina hidroxilasa varían considerablemente dependiendo de una serie de factores que incluyen entre otros las condiciones de extracción de la enzima, las condiciones de ensayo y los tipos y concentraciones de cofactor utilizado (Joh y col., 1986). Es difícil obtener tirosina hidroxilasa de alta pureza, ya que la enzima presenta un cierto grado de inestabilidad y una gran tendencia a agregarse con otras proteínas. La tirosina hidroxilasa parece ser la enzima limitante de la ruta sintética de las catecolaminas (Levitt y col., 1965). Esta enzima está regulada mediante dos tipos de mecanismos: uno a corto plazo, modificando la actividad de moléculas de enzima ya existentes, fundamentalmente mediante fosforilación (Atkinson y col., 1987), y otro a largo plazo, mediante un control a nivel transcripcional y traduccional (Lewis y col., 1987) y de la degradación de la enzima existente.

La degradación de la dopamina se realiza fundamentalmente a través de dos enzimas: la monoamino oxidasa tipo B (MAO B) (Yu, 1986) y la catecol orto metil transferasa (COMT). La DA puede seguir dos rutas de degradación. Si es metabolizada por la MAO, se forma 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DHFA), que es rápidamente transformado en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por la enzima aldehído deshidrogenasa. Posteriormente, la acción de la COMT produce ácido homovanílico (HVA). En la segunda ruta, la DA es metabolizada por la COMT, produci-

éndose 3-metoxitiramina (3-MT). Sobre este metabolito actúa la MAO, con la formación de 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehído (MHFA), que es rápidamente oxidado hasta ácido homovanílico. La figura 2 muestra un esquema de esta ruta metabólica.

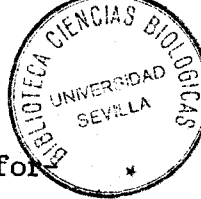
La catecol orto metil transferasa (COMT, EC 2.1.1.6) es la enzima que cataliza la transferencia de grupos metilo a grupos catecoles y sus derivados en presencia de S-adenosilmetionina (SAM), requiriendo cationes divalentes. Esta enzima se ha descrito en varias zonas del cerebro (Park, 1986). La COMT existe en dos formas enzimáticas, una soluble (S-COMT) y otra unida a membranas (MB-COMT) (Roth, 1980; Rivett y col., 1983a; Jeffrey y Roth, 1985). En humanos, la afinidad de la MB-COMT por las catecolaminas es alrededor de 100 veces mayor que la de la S-COMT (Rivett y col., 1982). Se ha sugerido que la S-COMT se encuentra principalmente en la glía, mientras que la MB-COMT se encuentra en las neuronas (Rivett y col., 1983a,b; Kaakola y col., 1987).

La DA está directamente relacionada con el control motor a nivel de la vía nigroestriada (buscar citas, Carlsson, 1959). Es fundamental la relación de la dopamina con la enfermedad de Parkinson, ya que los pacientes afectados por este mal muestran unas bajas concentraciones de dopamina en la sustancia negra y en el núcleo estriado, además de padecer una degeneración de la vía nigroestriada (Ehringer y Hornykiewicz, 1960; Jellinger, 1986). A parte de su intervención en funciones motoras, la dopamina parece tener una cierta participación en un sistema endógeno de supresión del dolor (Baumeister, 1988), en la termoregulación (Lagerspetz y col., 1974; Brown y col., 1982; Hajós y col., 1988) y en la regulación de la ingestión de alimentos y de las funciones gastrointestinales (Calisher y Avery, 1984; Savante y col.,

1985).

La noradrenalina se forma a partir de la dopamina por la acción de la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, característica de las neuronas adrenérgicas y noradrenérgicas. La degradación de la noradrenalina es la más compleja de las monoaminas estudiadas por nosotros. Si el primer paso de degradación es catalizado por la COMT, se produce normetanefrina (NMN). La acción de la MAO A (Yang y Neff, 1974) sobre la NMN produce el aldehído del ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (AAMHM). Este compuesto puede metabolizarse a través de la aldehído reductasa, dando 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), o a través de la aldehído deshidrogenasa, dando ácido vanillilmandélico (VMA). Si el primer paso de degradación de la noradrenalina es catalizado por la MAO, se produce el aldehído del ácido 3,4-dihidroximandélico (AADM). Este compuesto puede metabolizarse a través de la aldehído reductasa, dando 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG), o a través de la aldehído deshidrogenasa, dando ácido 3,4-dihidromandélico (ADM). La acción de la COMT sobre estos dos últimos compuestos (DHPG y ADM) produce nuevamente MHPG y VMA, que son conjugados como sulfatos y glucuronatos y eliminados por la orina. La figura 3 muestra un resumen de esta vía metabólica.

La NA parece estar implicada en la regulación de varias funciones importante, tales como la presión sanguínea, el sueño, las emociones y la memoria. También se ha especulado sobre la participación de la NA en las depresiones maníacas, fundamentalmente en relación con la 5-HT. Aunque la hiperactividad dopaminérgica es la hipótesis más aceptada para explicar la esquizofrenia (Van Rossum, 1967; Meltzer y Stahl, 1976; Seeman, 1987), se propone también la participación de la NA en este trastorno (Hornykiewicz, 1982).



La dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH, EC 1.14.17.1) cataliza la transformación de dopamina en noradrenalina, usando como sustratos dopamina y oxígeno molecular, y ácido ascórbico como donador de electrones. La DBH se localiza en las vesículas de las terminales de neuronas adrenérgicas y noradrenérgicas del cerebro (Nagatsu, 1986). Los cuerpos de estas neuronas noradrenérgicas están localizados en el locus coeruleus.

A pesar de las similitudes bioquímicas y estructurales de los sistemas serotoninérgico y catecolaminérgico, estos dos tipos de neuronas tienden a ser antagónicas. Así, la noradrenalina inhibe la liberación de serotonina inducida eléctricamente en slices de cerebro (Göthert y Huth, 1980). Los efectos motores mediados por terminales dopaminérgicas en el estriado y en el núcleo accumbens se ven reducidos por la actividad serotoninérgica (Carter y Pycock, 1979). Así, algunos autores han encontrado proyecciones serotoninérgicas en el locus coeruleus (Léger y Descarries, 1978; Léger y col., 1979). Estas proyecciones serotoninérgicas parecen estar implicadas en el control de la actividad TH (Renaud y col., 1975; Pujol y col., 1978). Teniendo en cuenta que la TH es la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, se ha propuesto que el papel funcional de la 5-HT en el locus coeruleus es ejercer un control transneuronal específico sobre la TH (McRae-Degueurce y col., 1982) y por tanto, un control efectivo sobre la neurotransmisión noradrenérgica. Por otra parte, los núcleos del rafe reciben aferentes noradrenérgicas del locus coeruleus (Jones y Moore, 1977; Baraban y Aghajanian, 1981), y aferentes dopaminérgicas de la substantia nigra (Stern y col., 1979). Desde el momento en que hay terminales serotoninérgicas en el locus coeruleus y terminales catecolaminérgicas en los núcleos del rafe, existe un amplio campo

para la interacción fisiológica de estos dos sistemas. Este antagonismo resulta muy claro en el núcleo geniculado lateral de la rata. Allí, la noradrenalina acelera la actividad espontánea, mientras que la serotonina enlentece el ritmo de estas descargas (Rogawski y Aghajanian, 1980b).

## 1.2. ASPECTOS ESTRUCTURALES DE LA VIA VISUAL

La visión es, entre los sentidos clásicos, el que aporta al ser humano una representación más completa del medio ambiente circundante. Los estudios sobre la física y la óptica del ojo tienen siglos de antigüedad, y han permitido comprender los mecanismos que concentran la luz sobre la retina. El proceso de fototransducción es conocido actualmente casi al detalle. Los trabajos de Hubel y Wiesel permitieron entender como llegan hasta el cerebro las señales eléctricas producidas por la retina. Estas señales tienen que ser procesadas por el cerebro para obtener una imagen coherente del entorno que le rodea. El procesado de la información visual se realiza en unas estructuras cerebrales que se agrupan bajo el término de **vía visual**. La vía visual se subdivide en dos vías, llamadas vía geniculada (que comprende el núcleo geniculado lateral y la corteza visual), y vía extrageniculada (formada por el colículo superior y el tálamo posterior).

El núcleo geniculado lateral es la primera estructura que encuentran los axones de las células ganglionares. El núcleo geniculado lateral se subdivide en una parte dorsal y una medial, separadas por un plexo internuclear. Ambas partes reciben aferentes retinianas y corticales, pero sólo la parte dorsal proyecta a la corteza visual. El geniculado está bordeado en su parte dorsolateral por el hipocampo y las fimbrias del hipocampo, y en su parte medial por una serie de

núcleos talámicos. El núcleo geniculado recibe aferentes ipsi y contralaterales, siendo estas últimas en la rata mucho más abundantes que las primeras. Las proyecciones de las células ganglionares sobre el núcleo geniculado muestran una organización retinotópica. La parte dorsal del geniculado de la rata muestra unos esbozos elementales de la organización laminar propia de animales superiores. La segunda aferencia al núcleo geniculado en orden de importancia procede de la corteza visual (Goodman y Horel, 1966; Montero y Guillery, 1968). Los axones de esta proyección surgen de las células piramidales medianas y pequeñas de las capas 5 y 6 del área 17. La eferencia principal del núcleo geniculado alcanza a la corteza visual. Hay también proyecciones al colículo superior que terminan principalmente en el tercio medial del estrato óptico. Dentro del núcleo geniculado pueden distinguirse dos tipos de neuronas: aquellas cuyos axones se extienden fuera de los límites del núcleo y que se conocen como neuronas de proyección, y aquellas cuyos axones hacen sinapsis dentro de los límites del núcleo, llamadas neuronas intrínsecas o interneuronas.

La otra estructura que forma parte de la vía geniculada es la corteza visual, que en la rata está situada en el tercio posterior de la superficie dorsal de los hemisferios cerebrales. La CV está compuesta por seis capas, denominadas desde la superficie hacia el interior de la estructura como capa plexiforme, granular externa, de células piramidales medianas, granular interna, de células piramidales grandes, y de células poliédricas (Krieg, 1946). La corteza visual recibe aferentes de dos fuentes fundamentales: las neuronas de proyección del núcleo geniculado, y las fibras comisurales del cortex estriado contralateral. Existen además otras aferentes procedentes de la

retina. De la corteza visual parten dos tipos de eferentes, llamadas fibras de asociación y fibras extracorticales de proyección. Las fibras de asociación conectan entre sí áreas de la corteza visual (áreas 17, 18 y 18 A), en tanto que las fibras extracorticales proyectan sobre el tálamo, el subtálamo, la región pretectal y el colículo superior. En la corteza visual pueden distinguirse dos tipos de células, llamadas piramidales y no piramidales.

El colículo superior está situado en la superficie dorsal del mesencéfalo, en un área llamada "tectum", en posición posterior a los colículos inferiores, que están implicados fundamentalmente en funciones auditivas. El colículo se divide en siete capas (Langer y Lund, 1974). Las capas superficiales, poco desarrolladas en la rata, están íntimamente asociadas con los centros visuales primarios, y están inervadas por axones procedentes fundamentalmente de tres fuentes: las proyecciones retinianas ipsi y contralaterales, y las proyecciones de la corteza visual ipsilateral. Las aferentes retinianas superan considerablemente en número a las corticales, siendo las proyecciones retinianas contralaterales más abundantes que las ipsilaterales. La parte medial del colículo superior también recibe aferentes de una zona del núcleo geniculado que no proyecta a la corteza visual. En el colículo, las eferentes del geniculado se solapan con las proyecciones procedentes de las áreas estriada y preestriada del neocortex. Existe una correspondencia entre las proyecciones retinianas y las corticales en el colículo superior. La retina proyecta sobre la corteza visual de tal manera que las áreas corticales que reciben unas aferentes retinianas concretas proyectan precisamente sobre las zonas del colículo superior que reciben proyecciones de estas mismas áreas retinianas. Las principales eferencias de las capas



superficiales del colículo superior se dirigen hacia el tálamo y hacia las capas profundas del propio colículo superior. Estas capas profundas forman conexiones eferentes con áreas del tronco cerebral y con regiones del tálamo posterior.

El tálamo es un centro de integración y relevo para la transmisión de la información sensoriomotora hacia la corteza cerebral (Jones, 1985). El tálamo posterior recibe proyecciones aferentes del colículo superior (Altman y Carpenter, 1961; Donnelly y col., 1983), el pretectum (Berman, 1977; Thompson y Robertson, 1980), la corteza visual (Kawamura y col., 1974; Updyke, 1977), la retina (Berman, 1977) y el cerebelo (Itoh y col., 1979). El tálamo desempeña un papel importante en la vía visual extrageniculada. Este núcleo participa en la integración de ciertos movimientos oculares (Crommelick y col., 1977).

Las diferentes estructuras de la vía visual están interconectadas de una forma bastante compleja, y muestran una clara organización retinotópica, lo que significa que en cada una de estas estructuras existe una proyección topológicamente equivalente de la retina.

La extensa inervación serotoninérgica presente en el cerebro parte de los llamados "núcleos del rafe". El primer mapa de cuerpos celulares serotoninérgicos se debe a Dahlstrom y Fuxe (1964). Estos autores describieron la existencia de nueve grupos celulares, numerados B1 a B9, la mayoría de los cuales estaban situados dentro de los ya mencionados núcleos del rafe. Las aferencias serotoninérgicas de las estructuras de la vía visual proceden de diferentes núcleos del rafe. Así, el colículo superior y el tálamo reciben sus aferencias del grupo B3, llamado núcleo magno del rafe, y del grupo B5, llamado núcleo pontis del rafe. El núcleo geniculado lateral recibe aferentes del

grupo B7, en tanto que la corteza visual las recibe de los grupos B5 y B7.

La inervación dopaminérgica tiene su origen fundamentalmente en el grupo A9, que se corresponde fundamentalmente con la substantia nigra, y en el grupo A10, correspondiente fundamentalmente al área tegmental ventral. El grupo A8, situado caudalmente con respecto al A9, también contribuye a esta inervación dopaminérgica.

La inervación noradrenérgica aferente a las estructuras de la vía visual procede del locus coeruleus (Swanson y Hartman, 1975).

### 1.3. ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento está asociado con cambios fisiológicos tales como el acortamiento del periodo de sueño, disminución de la actividad motora, alteraciones en la función endocrina, pérdida de agudeza mental y deterioro de los órganos sensoriales periféricos, entre ellos un deterioro de la función visual. Una aproximación al estudio de los déficits funcionales característicos del envejecimiento ha consistido en la medida de los índices de sistemas neurotransmisores específicos, lo que ha permitido establecer la pérdida de ciertos tipos específicos de neuronas en enfermedades como el Parkinson o el Huntington. Existe una amplia literatura sobre los cambios en los índices de neurotransmisores durante el periodo postnatal; muchos de estos índices muestran cambios rápidos coincidiendo con el desarrollo de las conexiones sinápticas (Hattori and McGeer, 1973). La disminución de los índices de ciertos neurotransmisores puede reflejar la pérdida de neuronas o una reducción en el número y la función de las sinapsis. La mayor parte de la información disponible sobre los efectos funcionales del

envejecimiento hace referencia a los niveles de los propios neurotransmisores y a las actividades de sus enzimas de síntesis y degradación. El estudio de las enzimas sintéticas es especialmente útil ya que actúan como marcadores de tipos celulares concretos, y son un buen índice de la integridad de las neuronas. Bertler y col., (1966) y Carlsson y Winbland (1976) encontraron con la edad un descenso significativo del contenido de dopamina en el caudado y en el putamen. Por otra parte, Robinson y col. (1977) no encontraron una pérdida de dopamina con el envejecimiento ni en el caudado, ni en la substantia nigra ni en el globo pálido. En su estudio, el contenido de noradrenalina del hipocampo y el hipotálamo mostró una correlación significativa negativa con la edad, similar a la tendencia observada en todas las áreas excepto en la substantia nigra (todo esto en humanos). En otras especies animales, hay evidencias de que los niveles de DA y NA decrecen con la edad en ciertas áreas cerebrales. Así, la dopamina muestra bajadas del 25% en el neostriado, así como cambios relacionados con la edad en los niveles de DA y NA en el hipotálamo (Finch, 1973a,b; 1975). Joseph y col. (1978) han observado caídas del 50% en los niveles de DA en el estriado entre ratas adultas y viejas. Decrecimientos relacionados con la edad se han observado también en los niveles de DA y NA y en su turnover en el hipotálamo de rata (Simpkins y col., 1977) y en los niveles de NA en el hipotálamo y tronco cerebral de monos (Samorajski y Rolsten, 1973). Ritter y Pelzer (1979) han mostrado que la pérdida de NA producida por el estrés es más severa en las ratas adultas que en las viejas, y sugieren un descenso en el tamaño del compartimento funcional de NA con el envejecimiento, lo cual puede tener importancia en el aumento de los desórdenes depresi-

vos en humanos viejos.

Se han observado descensos de la actividad TH y AADC en ciertas áreas cerebrales en algunas regiones cerebrales. Sin embargo, hay áreas en las que no existe una correlación entre la actividad TH y la edad, aunque parecen mostrar cierta tendencia a la bajada. Estas áreas son el hipocampo, el área septal, el tubérculo olfatorio, el globo pálido anterior, el hipotálamo, la sustancia negra, el locus coeruleus y el núcleo rojo (todo esto en humanos). En rata, se observa un descenso de actividad TH en ciertas áreas (McGeer y col., 1971). Sin embargo, existe una controversia en estas observaciones (Reis y col., 1977). Así, se observan aumentos de la actividad TH en torno al 18% en el hipotálamo, mientras que estructuras tales como el locus coeruleus, la substantia nigra y la corteza no muestran diferencias significativas entre los animales jóvenes y los viejos. Sin embargo, los cambios en el turnover de un neurotransmisor no tienen por qué estar acompañados por cambios en los niveles basales del mismo o de su enzima de síntesis. Hay pocos estudios sobre el turnover de aminas biógenas en animales viejos en comparación con los adultos. De los escasos datos disponibles se deduce que la actividad de un determinado tipo neuronal puede disminuir durante el envejecimiento en un área cerebral concreta mientras que puede no estar afectado en otra. En general, parece que los sistemas colinérgicos y catecolaminérgicos pierden actividad con el envejecimiento, en tanto que la situación de los sistemas GABAérgicos y serotoninérgicos no es clara.

Los efectos del envejecimiento sobre el sistema serotoninérgico han sido menos estudiados que sobre los sistemas catecolaminérgicos, y los datos disponibles son más contradictorios. Así, Benetato y col. (1967) han observado decrecimientos de los niveles de 5-HT en el

hipotálamo de rata y mono, en tanto que Simpkins y col. (1977) no encontraron cambios de los niveles de 5-HT en esta estructura cuando estudió animales adultos y viejos. De acuerdo con sus datos, el turnover de 5-HT incrementó en los animales viejos. McNamara y col. (1977) han observado una menor acumulación de 5-HTP tras el tratamiento con NSD-1015 en los animales viejos que en los adultos.

De los trabajos consultados se desprende que no existe un patrón de comportamiento generalizable ni a todas las estructuras cerebrales ni a todos los sistemas de neurotransmisores. Así, es necesario tener en cuenta la región estudiada y el sistema en concreto. Además, de los diferentes datos disponibles puede extraerse la conclusión de que muchas de las funciones fisiológicas afectadas por el envejecimiento no dependen de la actividad de un solo sistema neurotransmisor, sino más bien del balance entre diferentes sistemas en un área cerebral dada. A pesar de la escasez de datos disponibles, se observa claramente la alteración dependiente de la edad de la capacidad de respuesta de los viejos hacia tratamientos con drogas (Bender, 1970; Kent, 1976; Beck, 1978). Todas estas observaciones implican que el proceso del envejecimiento puede ser mejorado mediante el uso de sustancias que alteren el metabolismo de los neurotransmisores (Cotzias y col., 1977; Samorajski, 1977). Sin embargo, el problema real del envejecimiento permanecerá sin solución hasta que no sepamos por qué algunos grupos celulares concretos se muestran tan sensibles al deterioro inducido por el envejecimiento.

#### 1.4. ASPECTOS TEORICOS DE LAS MEDIDAS DE TURNOVER

El comportamiento dinámico de una sustancia se estudia dentro de un sistema. Los estudios *in vivo* en el sistema nervioso asumen que estos sistemas son abiertos, lo que significa que existen unos precursores que entran en el sistema y unos metabolitos que lo abandonan. El comportamiento de una sustancia dentro de un sistema no tiene por qué ser necesariamente uniforme, y el sistema puede contener uno o varios compartimentos para esa sustancia. El compartimento se define como una cantidad de sustancia que tiene una cinética de transformación distinguible de la de otra sustancia, siendo además uniforme. Los límites de un compartimento no tienen que coincidir necesariamente con fronteras morfológicas, por lo cual una cierta estructura puede contener varios compartimentos, y un compartimento abarcar más de una estructura. El tamaño de un compartimento viene dado habitualmente en unidades de masa. Se asume generalmente que los sistemas y sus compartimentos están es estado estacionario, es decir, que la tasa de entrada es igual a la tasa de salida. Así, la tasa de entrada de una sustancia es igual a su tasa de turnover (renovación). El término turnover indica en sentido cualitativo el proceso de transferencia de las sustancias entre compartimentos. El término tasa de turnover denota aspectos cuantitativos, y viene expresado como unidad de masa partido por unidad de tiempo. El término tasa fraccional de turnover se usa para expresar la velocidad de entrada o salida de una sustancia en un compartimento, pero en relación al tamaño de dicho compartimento. Las unidades de la tasa fraccional son tiempo<sup>-1</sup>.

Los estudios del turnover de una sustancia pueden llevarse a cabo siguiendo dos métodos: en condiciones de estado estacionario, y en

condiciones alejadas del mismo. En el primer caso, los compartimentos se estudian mediante el uso de marcadores, que son formas de la sustancia objeto de estudio marcadas mediante un isótopo radioactivo o no radioactivo. El marcador ideal es aquel que los sistemas biológicos no pueden distinguir de molécula original, y que puede emplearse en concentraciones tan pequeñas que el estado estacionario no se ve en los estudios alejados del estado estacionario, se emplean drogas que bloquean alguno de los pasos de transformación o translocación de las sustancias, o de alguno de sus precursores o productos. La droga ideal produce un bloqueo específico de sólo uno de los procesos que atañen a la sustancia en estudio, sin producir ningún tipo de interferencia con otros procesos que puedan afectar a la propia sustancia, a sus precursores o a sus productos, ni a ningún otro proceso metabólico que puede afectar al destino metabólico de estas sustancias.

Nosotros hemos elegido este segundo procedimiento para la realización de los estudios del turnover de monoaminas en la vía visual. En la sección siguiente (Material y Métodos) ofrecemos una relación de las drogas utilizadas.

## **2. MATERIAL Y METODOS**



## 2.1. ANIMALES

Todos los experimentos se llevaron a cabo usando ratas macho de la raza Wistar nacidas en nuestro laboratorio. Las ratas se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad, bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad, y con libre acceso al agua y la comida (dieta de mantenimiento A.04 de Panlab S.L.). Los animales utilizados se decapitaron entre las 10 y 11 a.m, y los cerebros se extrajeron rápidamente y se diseccionaron sobre hielo. Se extrajeron las siguientes áreas de la vía visual: núcleo geniculado lateral, corteza visual (áreas 17 y 18), colículo superior y tálamo posterior. Todas las estructuras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La figura 4 muestra un esquema de la situación de estas estructuras.

## 2.2. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Para los análisis en HPLC se utilizaron los siguientes patrones: L-triptófano (Trp), 5-hidroxi-L-triptófano (5-HTP), 5-hidroxitriptamina (5-HT), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA), L- $\beta$ -3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), dopamina (DA, 3-hidroxitiramina), 3-metoxitiramina (3-MT), ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA, ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético), L-noradrenalina (NA), DL-normetanefrina (NMN) y 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), todos ellos de Sigma Chemical Co. (USA). También se utilizaron ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, de Sigma Chemical Co.); ácido cítrico, ácido fórmico y dietilamina (Merck); ácido octanosulfónico y acetonitrilo (Scharlau). El agua utilizada fue destilada, desionizada

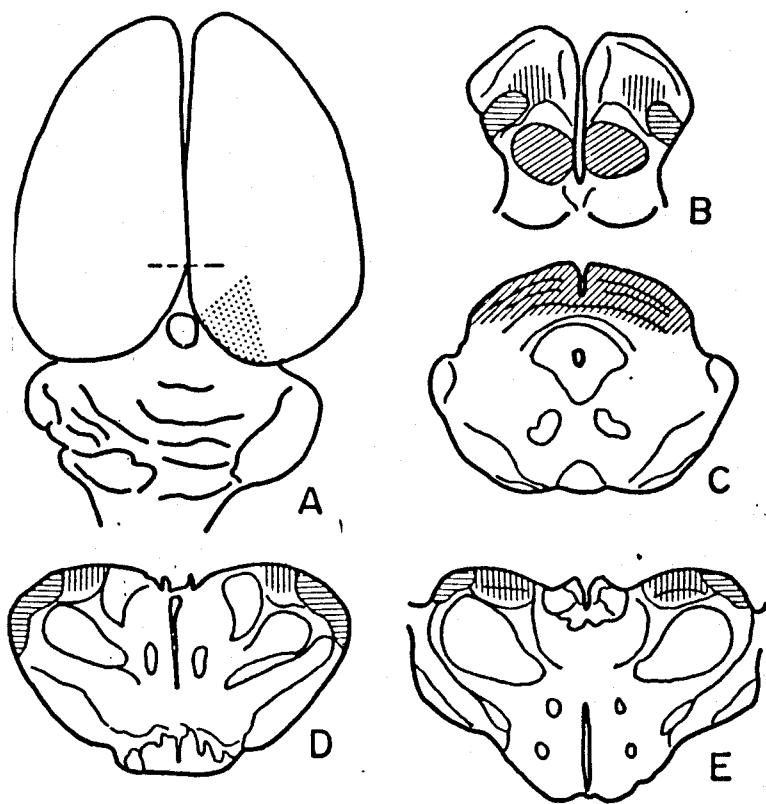


Fig. 1. Representación esquemática de las áreas diseccionadas. A: diagrama de una vista dorsal del cerebro de rata. La zona punteada representa la región extraída, correspondiente a la áreas 17 y 18 de la corteza cerebral de la rata. La línea discontinua representa la localización del esplenio del cuerpo calloso. B: diagrama de una vista dorso-lateral del mesencéfalo y diencefalo de la rata después de la eliminación de la corteza cerebral. Las zonas rayadas representan las estructuras diseccionadas. Las líneas oblicuas corresponden a los colículos superiores; las líneas horizontales muestran el núcleo geniculado lateral; las líneas verticales representan el tálamo posterior.

y filtrada a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

En el estudio del turnover de aminas biógenas se utilizaron las siguientes drogas: m-hidroxibencilhidracina dihidroclorhídrico (NSD-1015), (n-metil-n-2-propinilbencilamina) hidrociorhídrico (Pargilina) y ácido (p-[dipropilsulfamoil] benzoico) (Probenecid), todas ellas de Sigma Chemical Co.

En las medidas de enzimas se utilizaron los siguientes productos y reactivos: 5-hidroxi-[G-<sup>3</sup>H]-triptamina creatinina sulfato (13 Ci/mmol) y L-[5-<sup>3</sup>H]-triptófano (30 Ci/mmol) de Amersham.  $\beta$ -[etil-1-<sup>14</sup>C]-feniletilamina hidrociorhídrico (56 mCi/mmol), L-[anillo-3-5-<sup>3</sup>H]-tirosina (50 Ci/mmol) y agua tritiada (1 mCi/g) de New England Nuclear. 2,5-difeniloxazol (PPO),  $\beta$ -feniletilamina hidrociorhídrico ( $\beta$ -PEA), Tris[hidroximetil]aminometano (Tris), DL-ditio-treitol (DTT), DL-6-metil-5,6,7,8-tetrahidropterina (6-MPH<sub>4</sub>), Norit GSX y acetato sódico de Sigma Chemical Co. Acido ascórbico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, albúmina, carbonato sódico, fosfato sódico potásico y sulfato amónico ferroso de Merck. Otros solventes y reactivos fueron de alto grado de pureza y se obtuvieron de proveedores habituales.

### 2.3. APARATOS

El equipo de HPLC utilizado en la valoración de las aminas biógenas y sus metabolitos en las diferentes estructuras cerebrales consistió en una bomba Kontron 420, un detector electroquímico (amperímetro LC 4B de BAS), un integrador Hitachi D-2000 y columnas LiChroCART 125-4 (LiChrospher 100 RP 18 de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula) de Merck. Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrifuga refrigerada Centrikon H-401 de Kontron y una microfuga Hettisch Mikro-

liter. La homogeneización de las estructuras estudiadas se hizo en un equipo Labsonic 1510 de Braun. Los contajes de material radioactivo se realizaron en un equipo de centelleo líquido LS 1800 de Beckman. Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 1750 de Philips.

#### 2.4. MEDIDA DE AMINAS BIOGENAS Y SUS METABOLITOS EN EL CEREBRO

Las diferentes estructuras cerebrales estudiadas se homogeneizaron mediante sonicación diluidas en ácido perclórico 0,1 M y bisulfito sódico 1 mM. Las muestras se centrifugaron a 30000xg durante 15 minutos a 4 °C, y los sobrenadantes se filtraron mediante rotación a baja velocidad (1000xg) a través de filtros de 0,2 µm de diámetro de poro. Los filtrados resultantes (pH 1) se neutralizaron hasta alcanzar un pH de 3,0 aproximadamente mediante la adición de un 10% (v/v) de una mezcla del tampón de la fase móvil con NaOH 5N en una proporción 3:1. Las muestras así neutralizadas se inyectaron mediante un inyector de alta presión (Rheodine 7125-075) con un bucle de llenado de 20 µl. Los análisis se realizaron isocráticamente a temperatura ambiente y a un flujo de 1 ml/min. El potencial del detector se mantuvo a +0,8 V. La fase móvil se preparó de acuerdo con DiBussolo y col. (1983) con modificaciones (disolución acuosa de ácido fórmico 100 mM, ácido cítrico 1 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanosulfónico 0,35 mM, dietilamina 0,25% v/v y acetonitrilo 4,0% v/v, pH 3,1). La mezcla de solventes se filtró a través de filtros de 0,45 µm de diámetro de poro mediante vacío, con lo que se eliminan pequeñas burbujas de aire que puedan interferir en el análisis. Las concentraciones de sustancias en el cerebro se calcularon mediante el uso de curvas de calibración obteni-

das mediante la inyección de patrones puros. Estos patrones se prepararon disueltos a razón de 1 mg/ml en ácido perclórico 0,1 M y bisulfito sódico 1 mM, y se conservaron a +4 °C hasta el momento de su utilización (máximo 2 meses). La correcta identificación de los diferentes compuestos encontrados en los cromatogramas se llevó a cabo mediante el estudio de muestras cerebrales y soluciones de patrones a diferentes potenciales de oxidación. Muestras y patrones mostraron un comportamiento electroquímico similar, lo que permitió apoyar la especificidad del método de ensayo. Los cambios postmortem en las concentraciones de aminas biógenas son despreciables dado el corto intervalo de tiempo transcurrido entre el sacrificio del animal y la congelación en nitrógeno líquido de las estructuras estudiadas.

## 2.5. DROGAS

En los estudios del turnover de las aminas biógenas y sus metabolitos se emplearon tres diferentes drogas: la 3-hidroxibenzilhidracina (NSD-1015) se utilizó como inhibidor de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC; EC 4.1.1.28) en dosis de 100 mg/kg; la (n-metil-n-2-propinilbencilamina) hidroclorehidrico (Pargilina) se utilizó como inhibidor de la monoamino oxidasa (MAO; EC 1.4.3.4) en dosis de 75 mg/Kg; el ácido (p-[dipropilsulfamoil] benzoico) (Probenecid) se utilizó como inhibidor del sistema de transporte de metabolitos ácidos en dosis de 250 mg/Kg. NSD-1015 y pargilina se disolvieron en NaCl 0,9%, en tanto que el probenecid se disolvió en ácido fosfórico 50 mM, neutralizándose la disolución hasta pH fisiológico con NaOH 0,5 N. Las tres drogas se administraron mediante inyección intraperitoneal, y el

volumen de inyección fue de 5 ml/Kg en todos los casos.



## 2.6. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL CEREBRO

### 2.6.1. TRIPTOFANO HIDROXILASA

El método usado para la determinación de la actividad Triptófano hidroxilasa fue el descrito por Beevers y col. (1983), con ligeras modificaciones. Las muestras de tejido se homogeneizaron mediante pulsos de ultrasonido en 4 volúmenes de Tris-HCl 50 mM con DTT 2mM, pH 7,6 a 4 °C. El homogeneizado se centrifugó a 40000xg durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la medida de actividad. La mezcla de ensayo fue Tris-HCl 50 mM, DTT 15 mM, L-(5-<sup>3</sup>H)triptófano 0,5 mM (1,5 µCi/µmol), 6-MPH<sub>4</sub> 0,5 mM en un volumen final de 200 µl que contenían aproximadamente 0,6 mg de proteína. La reacción se inició mediante la adición del triptófano. Los tubos se incubaron con agitación durante 30 minutos a 37 °C. Tras este periodo de incubación se añadieron a cada tubo 50 µl de ácido perclórico al 60%. A esto siguió un segundo periodo de incubación de 20 minutos a la misma temperatura. Terminado este, y tras permitir que los tubos alcanzasen la temperatura ambiente, se añadieron a cada tubo 250 µl de una suspensión de carbón activo (Norit GSX, 50 mg/ml). Después de una centrifugación a 12000xg durante 5 minutos a 4 °C, se extrajeron de cada tubo 250 µl de sobrenadante que se añadieron a miniviales para conteo. Los miniviales contenían 5 ml de líquido de centelleo (600 ml de xileno, 257 ml de tritón X-100, 106 ml de etanol, 37 ml de propilenglicol y 3 g/l de PPO).

### 2.6.2. TIROSINA HIDROXILASA

La actividad Tirosina hidroxilasa fue medida según el método de

Levine y col., (1984). Las muestras de tejido se homogeneizaron mediante pulsos de ultrasonido en 10 volúmenes de tampón acetato sódico 0,5 M pH 6, con Tritón X-100 al 0,1% . El homogeneizado se centrifugó a 40000xg durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad. La mezcla de ensayo contenía tampón fosfato 50 mM pH 6, ácido ascórbico 1 mM, sulfato amónico ferroso 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 40 mM, 6-MPH<sub>4</sub> 1 mM y L-(3,5-<sup>3</sup>H)-tirosina 10 mM (2 mCi/mmol) en un volumen final de 200  $\mu$ l que contenían aproximadamente 0,3 mg de proteína. La reacción se inició mediante la adición de la tirosina. Después de una incubación de 15 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo por la adición a cada tubo de 50  $\mu$ l de carbonato sódico 3 M (pH 11,6). La mezcla de reacción se añadió a miniviales de centelleo líquido que contenían 5 ml de líquido de centelleo (tolueno:alcohol isoamílico 3:1, 4g/l de PPO), agitándose vigorosamente antes de su contaje.

### 2.6.3. MAO-A Y MAO-B

El método para la determinación de la actividad MAO se basó en los descritos por Vaccari (1983) y Tipton (1985), con algunas modificaciones. Las muestras de tejido se homogeneizaron mediante pulsos de ultrasonido en 15 volúmenes de tampón fosfato sódico potásico pH 7,4, y se centrifugaron a 1000xg durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad. La mezcla de ensayo contenía tampón fosfato sódico 80 mM, pH 7,4, 5-HT 1,5 mM (1 mCi/mmol) para la MAO-A y  $\beta$ -PEA 50  $\mu$ M (0,5 mCi/mmol) para la MAO-B, en un volumen final de 200  $\mu$ l que contenían aproximadamente 0,2 mg de proteína por tubo. La reacción se inició mediante la adición del

sustrato. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo por la adición de 125 µl de ácido perclórico 3 N. El producto de la reacción se extrajo mediante la adición de solvente de extracción (benceno:etilacetato 1:1 para MAO-A y tolueno:etilacetato 1:1 para MAO-B). La mezcla se centrifugó a 12000xg durante 5 minutos. Para su contaje, se añadieron alicuotas de 0,5 ml de la fase orgánica (sobrenadante) a miniviales de centelleo líquido que contenían 5 ml de líquido de centelleo (tolueno:tritón X-100 2:1, 5 g/l de PPO).

## **2.7. MEDIDA DE PROTEINAS**

La cuantificación de la concentración de proteínas en los diferentes extractos ensayados se hizo según el método descrito por Lowry y col. (1951).

## **2.8. ANALISIS ESTADISTICO**

Las pendientes de las rectas de regresión aplicadas al turnover se calcularon por el método de los mínimos cuadrados. La comparación entre dos medias se hizo mediante el test t de Student. Las comparaciones entre varias medias simultáneamente se hizo mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test t de Tukey (Steel y col., 1980).



### **3. RESULTADOS**

### **3.1. VIA GENICULADA**

#### **3.1.1. GENICULADO LATERAL**

##### **3.1.1.1. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA**

La actividad Tirosina hidroxilasa aumenta durante el desarrollo postnatal, con incrementos significativos entre los días 15 y 30 (38,3%,  $p < 0,05$ ) y los días 30 y 90 (26,4%,  $p < 0,05$ ; fig. 5 A).

##### **3.1.1.2. ACTIVIDAD TRIPTOFANO HIDROXILASA**

La actividad Triptófano hidroxilasa no muestra un aumento global durante el desarrollo, observándose un descenso de actividad entre los días 30 y 90 (-32,1%,  $p < 0,01$ ), y un aumento entre los días 90 y 180 (49,4%,  $p < 0,01$ ; fig. 6 A).

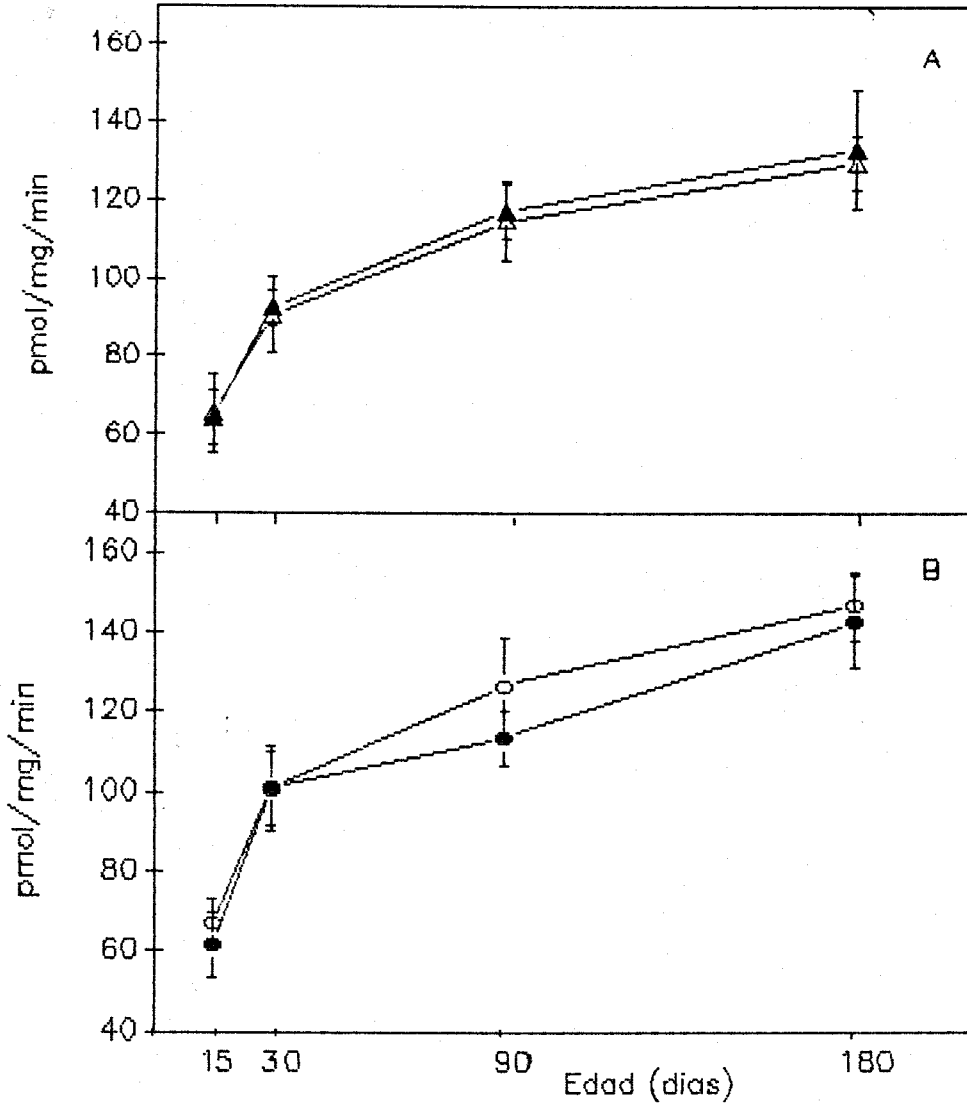
##### **3.1.1.3. ACTIVIDADES MAO A, MAO B Y RAZON MAO A/MAO B**

La actividad MAO A se mantiene sin cambios significativos durante los primeros 90 días de desarrollo postnatal. Desde este momento, se observa un decrecimiento de la actividad, con descensos significativos entre los días 90 y 180 (-26,4%,  $p < 0,01$ ), y entre el día 180 y los 2 años de edad (-15,0%,  $p < 0,01$ ; fig. 7 A).

La actividad MAO B se mantiene sin cambios significativos durante los primeros 90 días de desarrollo postnatal, observándose un aumento significativo entre los días 90 y 180 (37,4%,  $p < 0,01$ ), y entre este último punto y los 2 años de edad (24,0%,  $p < 0,01$ ; fig. 8 A).

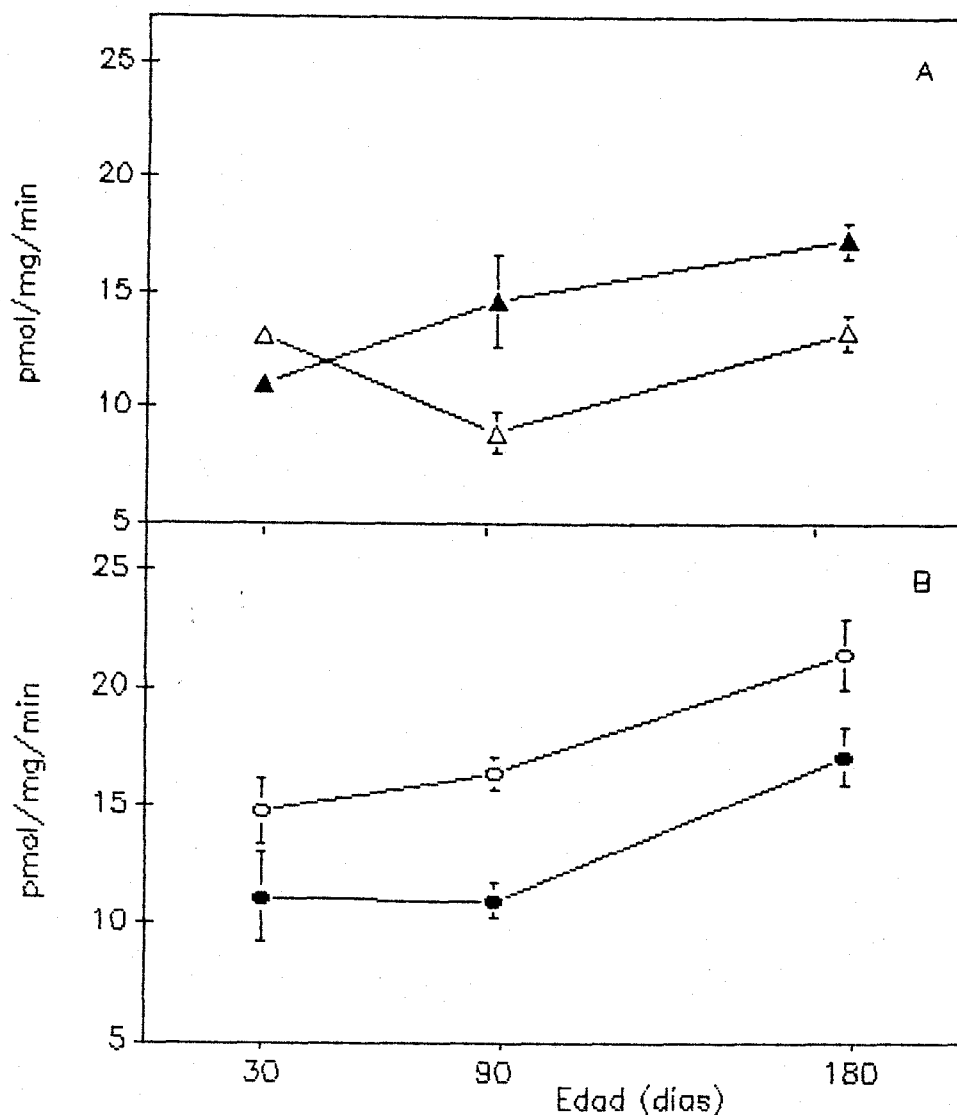
La razón MAO A/MAO B se mantiene sin cambios significativos entre los días 15 y 90. A partir del día 90, la razón disminuye hasta los 2 años, con descensos significativos entre los días 90 y 180 (-45,6%,

FIGURA 5



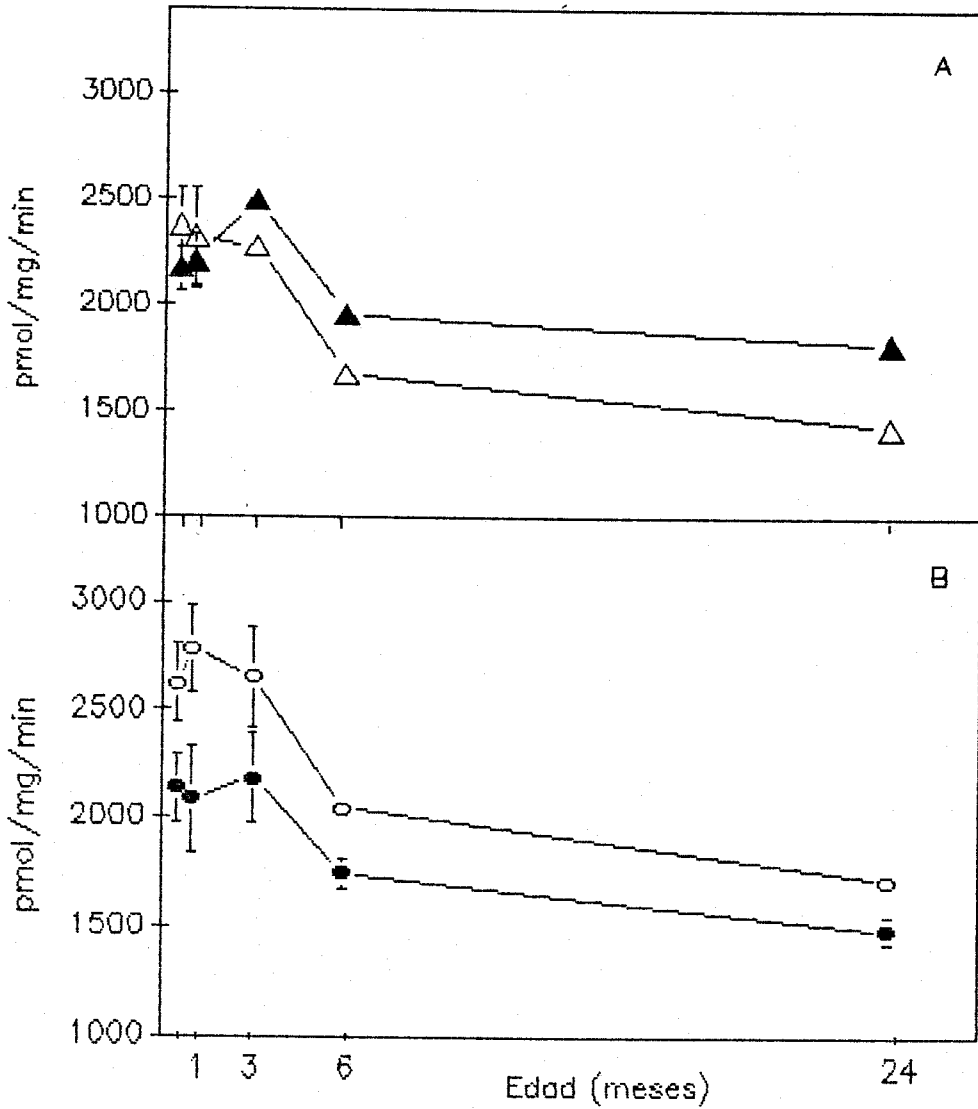
Medidas de la actividad Tirosina hidroxilasa en el geniculado lateral (triángulos vacíos) y la corteza visual (triángulos rellenos) (A), y en el colículo superior (círculos vacíos) y el tálamo posterior (círculos rellenos) (B) durante el desarrollo postnatal de la rata. Los puntos son la media  $\pm$  desviación estandar de cuatro experimentos independientes. Los resultados se expresan en pmol/mg/min.

FIGURA 6



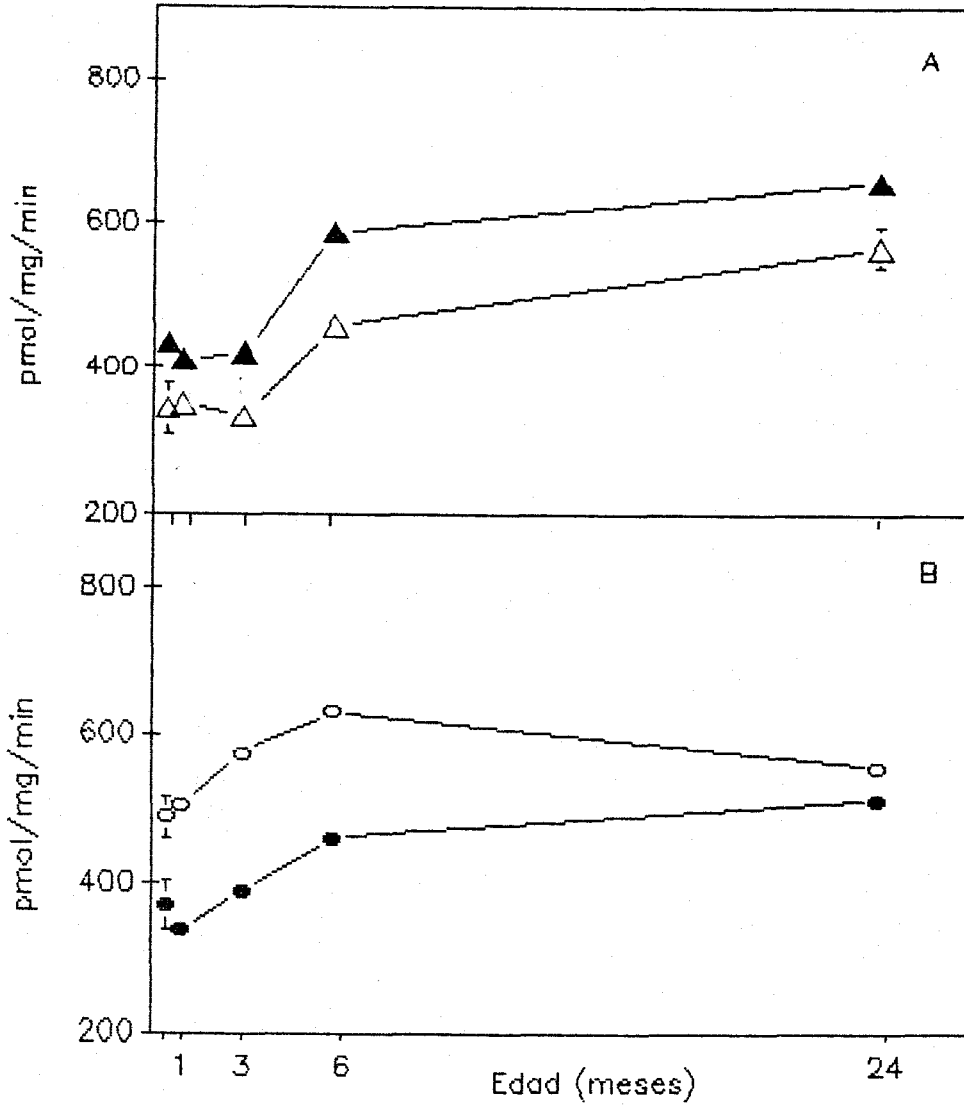
Medidas de la actividad TPH en el geniculado lateral (triángulos vacíos) y la corteza visual (triángulos rellenos) (A), y en el colículo superior (círculos vacíos) y el tálamo posterior (círculos rellenos) (B) durante el desarrollo postnatal de la rata. Los puntos son la media  $\pm$  desviación estandar de cuatro experimentos independientes. Los resultados se expresan en pmol/mg/min.

FIGURA 7



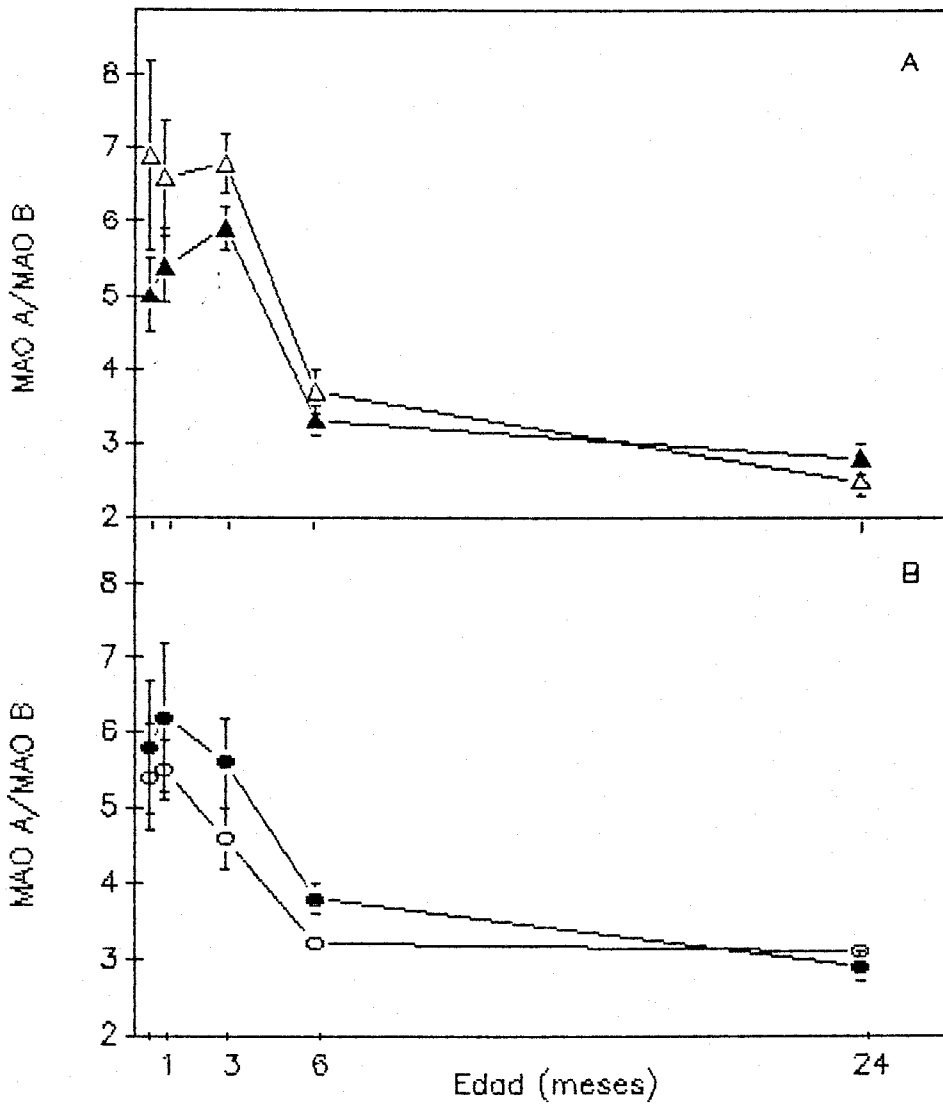
Medidas de la actividad MAO A en el geniculado lateral (triángulos vacíos) y la corteza visual (triángulos rellenos) (A), y en el colículo superior (círculos vacíos) y el tálamo posterior (círculos rellenos) (B) durante el desarrollo postnatal de la rata. Los puntos son la media  $\pm$  desviación estandar de cuatro experimentos independientes. Los resultados se expresan en pmol/mg/min.

FIGURA 8



Medidas de la actividad MAO B en el geniculado lateral (triángulos vacíos) y la corteza visual (triángulos rellenos) (A), y en el colículo superior (círculos vacíos) y el tálamo posterior (círculos rellenos) (B) durante el desarrollo postnatal de la rata. Los puntos son la media  $\pm$  desviación estandar de cuatro experimentos independientes. Los resultados se expresan en pmol/mg/min.

FIGURA 9



Razón de las actividades MAO A y MAO B, calculadas a partir de los datos de las figuras 4 y 5, en el geniculado lateral (triángulos vacíos) y la corteza visual (triángulos rellenos) (A), y en el colículo superior (círculos vacíos) y el tálamo posterior (círculos rellenos) (B) durante el desarrollo postnatal de la rata. Los puntos son la media  $\pm$  desviación estandar de cuatro experimentos independientes.

$p < 0,01$ ), y entre los 180 días y los 2 años (-32,4%,  $p < 0,01$ ; fig. 9 A).

#### 3.1.1.4. TASA DE ACUMULACION DE DA

Las concentraciones de DA en estado estacionario descienden en los animales viejos un 24,3% con respecto al valor adulto ( $p < 0,01$ ). Tras el tratamiento con pargilina, la DA muestra una acumulación lineal en ambos grupos (fig. 10 A). La tasa de acumulación desciende en los animales viejos un 40,5% con respecto al valor adulto ( $p < 0,01$ ; tabla I).

#### 3.1.1.5. TURNOVER DE DOPAC

Las concentraciones basales de DOPAC no muestran cambios significativos entre los animales adultos y los viejos. La declinación de DOPAC es exponencial en ambos grupos tras la administración de pargilina (fig. 10 B). La tasa fraccional de turnover es significativamente menor en los animales viejos (-18,7%,  $p < 0,01$ ) que en los adultos, mientras que la tasa de declinación no muestra cambios significativos entre ambos grupos (tabla II). Tras el tratamiento con probenecid, el DOPAC se acumula linealmente (fig. 10 C). La tasa de acumulación de los animales viejos es significativamente menor que la de los animales adultos (-22,2%,  $p < 0,05$ )(tabla III).

#### 3.1.1.6. TASA DE ACUMULACION DE NA Y NMN

Las concentración basal de NA de los animales viejos muestran un descenso significativo con respecto a la de los animales adultos (-15,6%,  $p < 0,05$ ). La acumulación de NA es lineal en ambos grupos tras el tratamiento con pargilina (fig. 11 A). La tasa de acumulación no



muestra cambios significativos entre los animales adultos y los viejos. La acumulación de NMN también fue lineal tras el tratamiento con pargilina (fig. 11 B). Las concentraciones en estado estacionario no muestran diferencias entre los animales adultos y los viejos, pero la tasa de acumulación de los animales viejos es un 66,7% mayor que la tasa de los adultos ( $p < 0,01$ ) (tabla II).

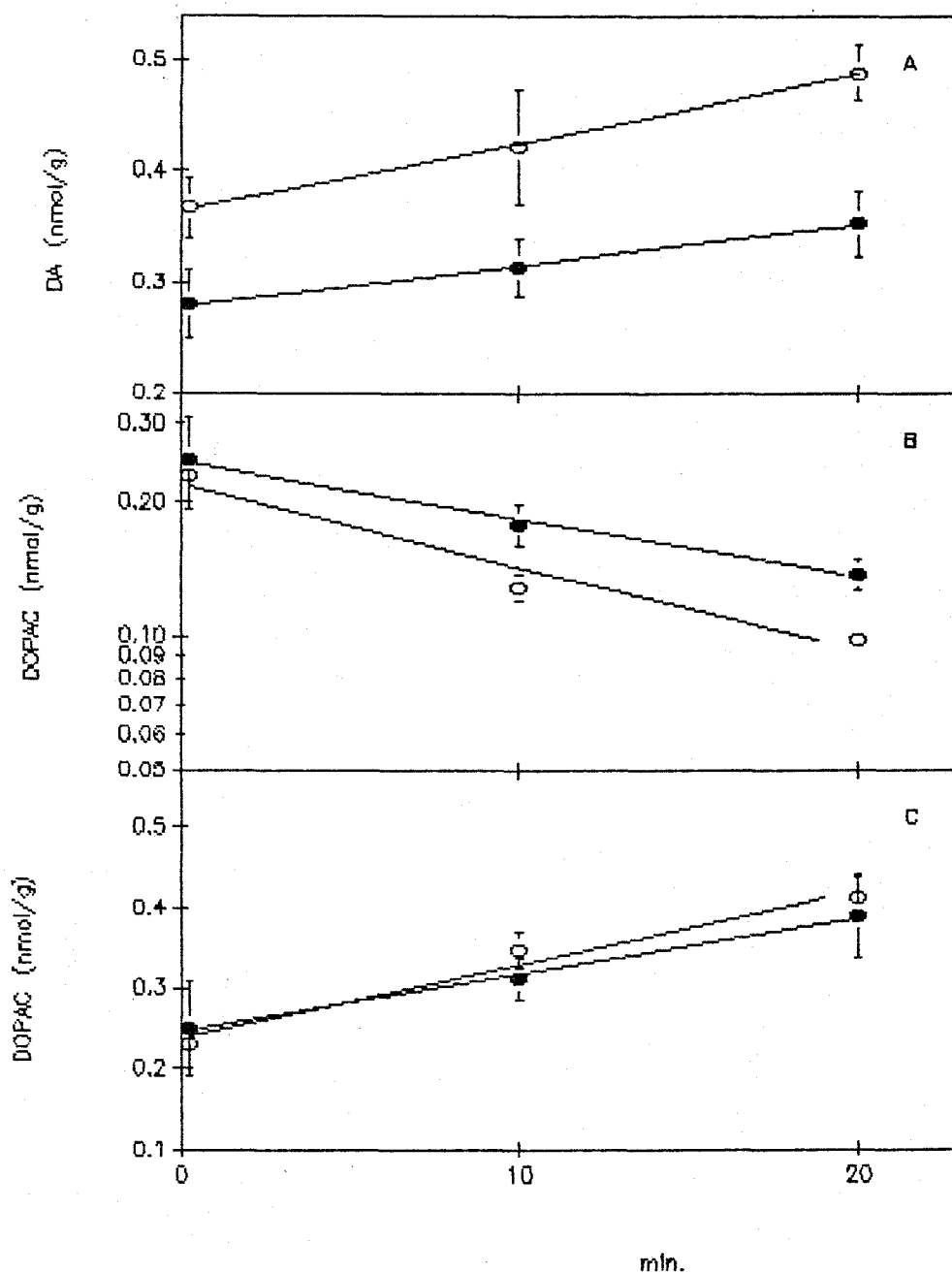
#### 3.1.1.7. TURNOVER DE MHPG

Las concentraciones basales de MHPG disminuyen significativamente en los animales viejos con respecto a los valores adultos (-10,4%,  $p < 0,01$ ). Tras el tratamiento con pargilina, la declinación de MHPG es exponencial en ambos grupos (fig. 12 A). Los animales viejos muestran una disminución en la tasa fraccional de turnover (-37,9%,  $p < 0,01$ ) y en la tasa de declinación (-44,2%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los valores adultos (tabla II). Tras el tratamiento con probenecid, la acumulación de MHPG es lineal en ambos grupos de animales (fig. 12 B). La tasa de acumulación de los animales viejos disminuye un 31,1% con respecto a los valores adultos ( $p < 0,01$ ) (tabla III).

#### 3.1.1.8. TASA DE ACUMULACION DE 5-HTP

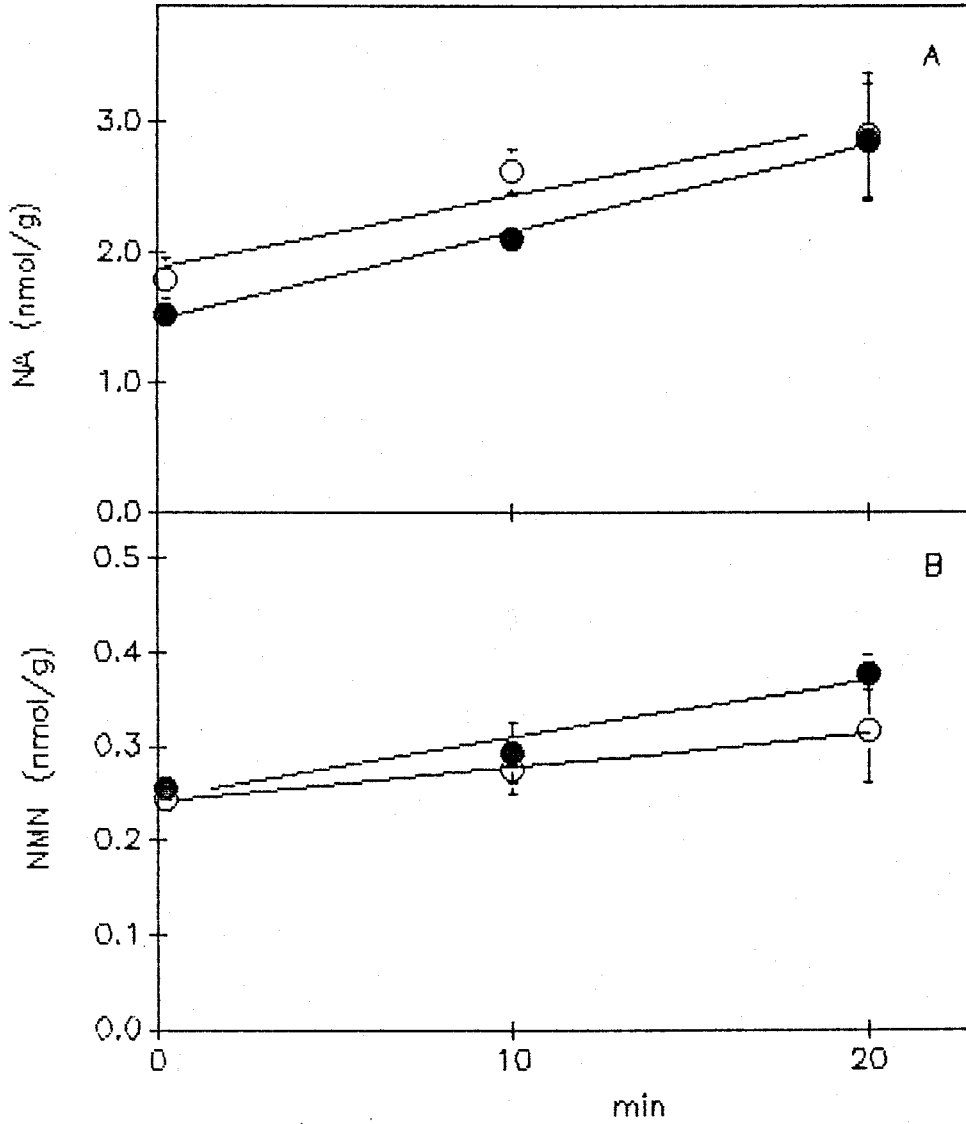
La tabla IV muestra las concentraciones basales y la tasa de acumulación del 5-HTP después del tratamiento con NSD-1015. La concentración en estado estacionario de los animales viejos disminuye un 60,0% con respecto a la de los animales adultos ( $p < 0,01$ ), en tanto que la tasa de acumulación permanece sin cambios significativos.

FIGURA 10



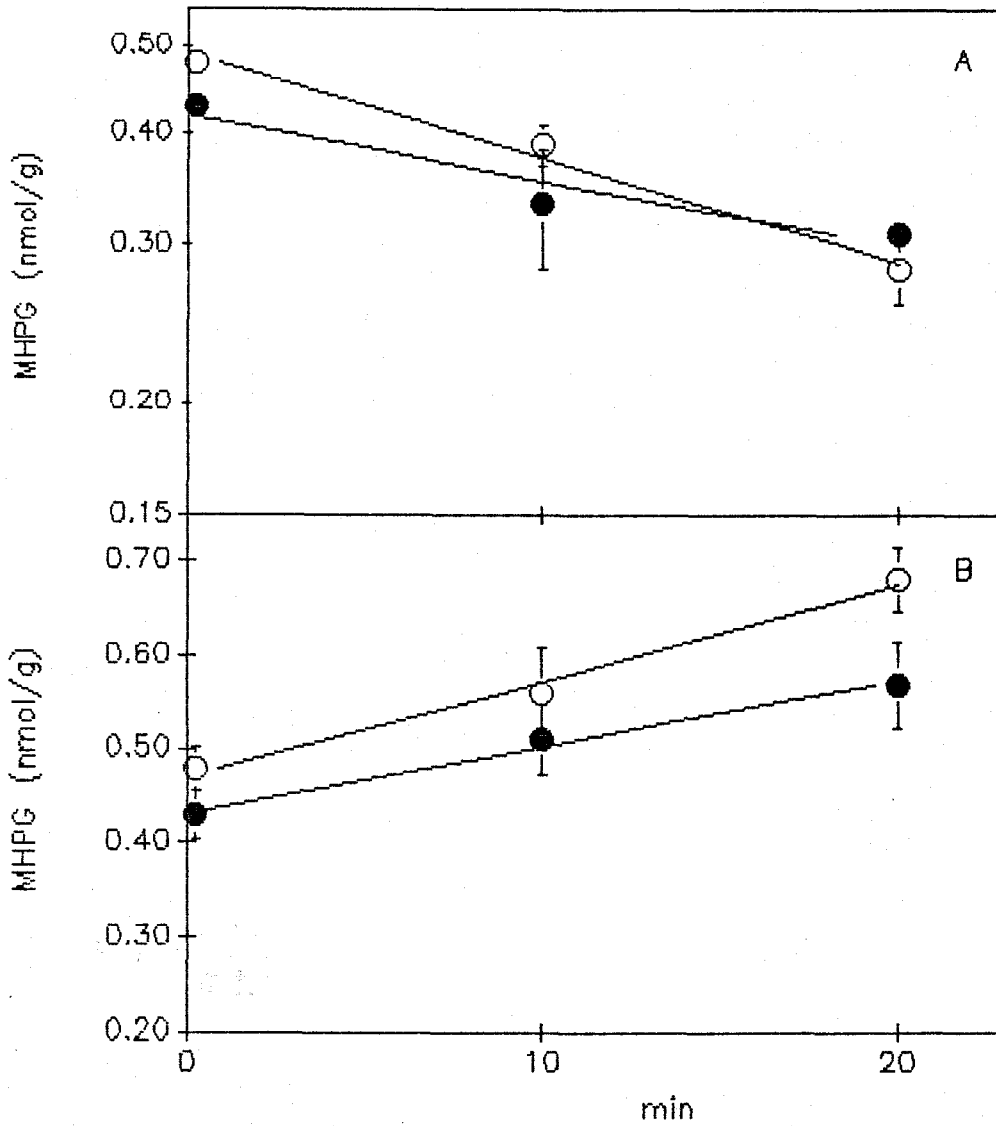
Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de DA (A) y DOPAC (B), y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) sobre la concentración de DOPAC (C) en el geniculado lateral de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

FIGURA 11



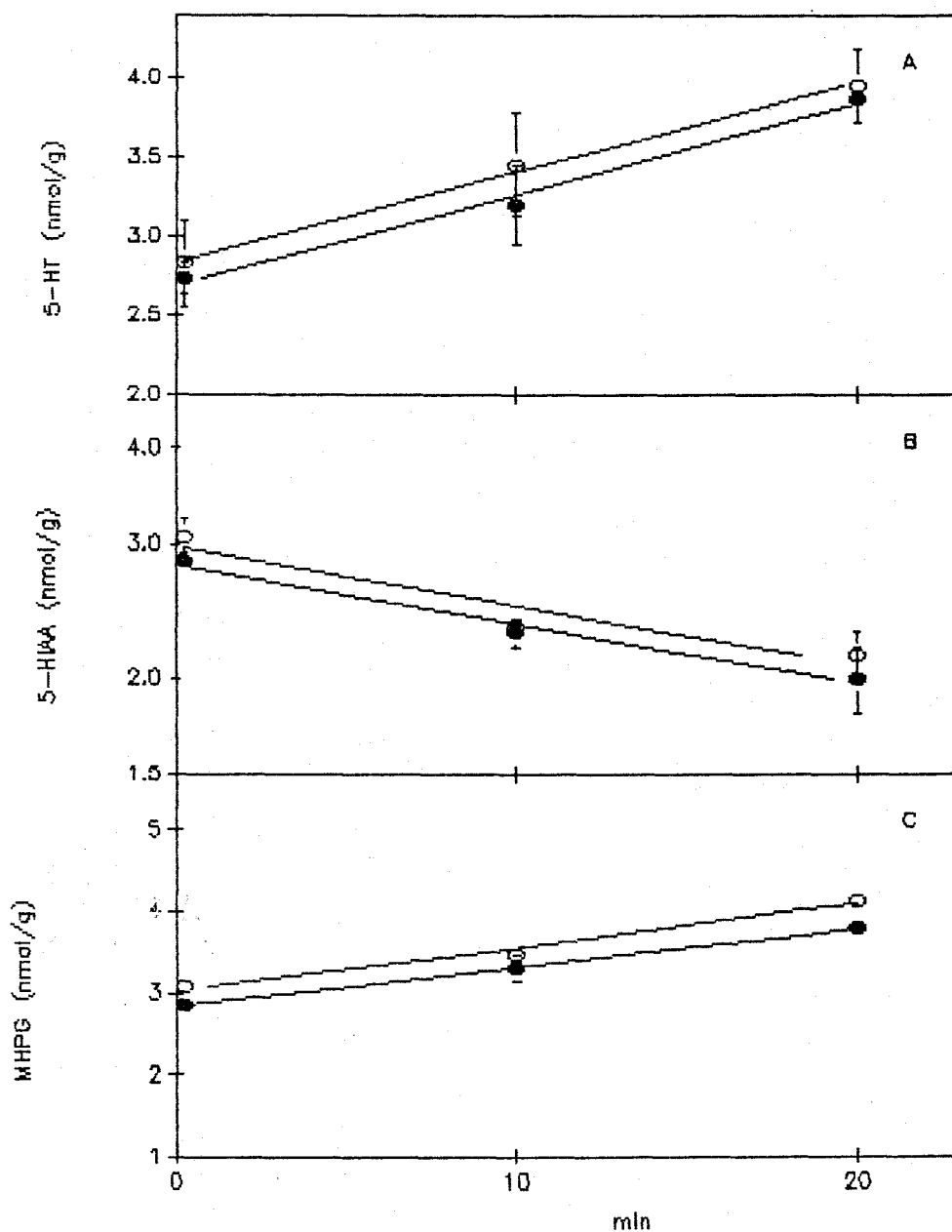
Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de NA (A) y NMN (B) en el geniculado lateral de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

FIGURA 12



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) (A) y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) (B) sobre la concentración de MHPG en el geniculado lateral de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

FIGURA 13



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de 5-HT (A) y 5-HIAA (B), y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) sobre la concentración de 5-HIAA (C) en el geniculado lateral de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

### 3.1.1.9. TASA DE ACUMULACION DE 5-HT

La acumulación de 5-HT es lineal en los animales adultos y en los viejos tras el tratamiento con pargilina (fig. 13 A). No hay cambios significativos entre las concentraciones en estado estacionario ni entre las tasas de acumulación de los animales adultos y los viejos (tabla I).

### 3.1.1.10. TURNOVER DE 5-HIAA

La concentración basal de 5-HIAA de los animales viejos disminuye un -7,5% con respecto a la de los adultos ( $p < 0,05$ ). La declinación de 5-HIAA es exponencial en ambos grupos tras el tratamiento con pargilina (fig. 13 B). La tasa fraccional de turnover y la tasa de declinación no muestran cambios entre los animales adultos y los viejos (tabla II). Tras el tratamiento con probenecid, la acumulación de 5-HIAA es lineal en los animales adultos y los viejos (fig. 13 C). La tasa de declinación de los animales viejos disminuye un -10,6% con respecto a la de los animales adultos ( $p < 0,01$ ) (tabla III).

### 3.1.1.11. CONCENTRACION DE DA Y DOPAC TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015

Tras la administración de NSD-1015, la concentración de DA disminuye en los animales adultos un 13,5% ( $p < 0,05$ ) con respecto a sus controles, pero no se observan cambios significativos en los animales viejos. La concentración de DOPAC muestra cambios similares a los observados en la DA, ya que los animales adultos tratados muestran una disminución del 34,8% ( $p < 0,01$ ) con respecto a los adultos controles, mientras que los animales viejos tratados no muestran cambios significativos con respecto a los animales viejos controles (tabla V).

### **3.1.1.12. CONCENTRACION DE NA Y NMN TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015**

La concentración de NA aumenta tanto en los animales adultos (30,7%,  $p < 0,01$ ) como en los viejos (59,6%,  $p < 0,01$ ) tratados con NSD-1015. Sin embargo, la concentración de NMN no muestra cambios significativos tras el tratamiento con NSD-1015 ni en los animales adultos ni en los viejos (tabla VI).

### **3.1.1.13 CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIAA TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015**

Tras la administración de NSD-1015, la concentración de 5-HT aumenta en los animales adultos (33,6%,  $p < 0,01$ ) y en los viejos (52,0%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los animales controles. La concentración de 5-HIAA en los animales tratados muestra una disminución con respecto a los valores controles, siendo esta disminución del 47,6% ( $p < 0,01$ ) en los animales adultos y del 33,5% ( $p < 0,01$ ) en los animales viejos (tabla VII).

## **3.1.2. CORTEZA VISUAL**

### **3.1.2.1. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA**

La actividad Tirosina hidroxilasa aumenta durante el desarrollo postnatal, siendo este aumento significativo entre los días 30 y 90 (44,2%,  $p < 0,01$ ) y los días 90 y 180 (26,3%,  $p < 0,05$ ; fig.5 A).

### **3.1.2.2. ACTIVIDAD TRIPTOFANO HIDROXILASA**

La actividad Triptófano hidroxilasa aumenta durante el desarrollo postnatal, siendo este aumento significativo entre todas las edades estudiadas (fig. 6 A).

TABLA I. TURNOVER DE DA, NA, NMN Y 5-HT EN EL GENICULADO LATERAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PARGILINA.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DA	0,37 ± 0,03	0,28 ± 0,03 **	1,37 ± 0,12 (10)	0,22 ± 0,06 (10) **
NA	1,79 ± 0,16	1,51 ± 0,04 *	3,48 ± 0,50 (10)	4,06 ± 0,74 (10)
NMN	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,21 ± 0,06 (10)	0,35 ± 0,06 (10) **
5-HT	2,83 ± 0,27	2,73 ± 0,10	3,26 ± 0,56 (12)	3,45 ± 0,28 (10)

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para la DA (ver fig. 10 A), la NA (ver fig. 11 A), la NMN (ver fig. 11 B) y la 5-HT (ver fig. 13 A). Las tasas de turnover son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.



TABLA II. TURNOVER DE DOPAC, MHPG Y 5-HIAA EN EL GENICULADO LATERAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PARGILINA.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Tasa fraccional ( $h^{-1}$ )		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DOPAC	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,06	2,62 ± 0,30 (11)	2,13 ± 0,17 (10) **	0,60 ± 0,14 (11)	0,53 ± 0,17 (10)
MHPG	0,48 ± 0,01	0,43 ± 0,01 **	1,61 ± 0,17 (10)	1,00 ± 0,15 (10) **	0,77 ± 0,10 (10)	0,43 ± 0,08 (10) **
5-HIAA	3,07 ± 0,16	2,84 ± 0,04 ‡	1,09 ± 0,12 (12)	1,07 ± 0,13 (12)	3,33 ± 0,53 (12)	3,03 ± 0,40 (12)

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para el DOPAC (ver fig. 10 B), el MHPG (ver fig. 12 A) y el 5-HIAA (ver fig. 13 B). Las tasas fraccionales de turnover ( $h^{-1}$ ) son la pendiente ± la desviación estandar de la recta de regresión de los logaritmos naturales de la concentración de los metabolitos, calculadas para el número de puntos que figura entre paréntesis. Las tasas de turnover (nmol/g/h) se calculan multiplicando los valores de las concentraciones basales por las tasas fraccionales de turnover, y son la media ± la desviación estandar. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA III. TURNOVER DE DOPAC, MHPG Y 5-HIAA EN EL GENICULADO LATERAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PROBENECID.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DOPAC	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,06	0,54 ± 0,07 (10)	0,42 ± 0,17 (10) *
MHPG	0,48 ± 0,01	0,43 ± 0,01 **	0,61 ± 0,13 (10)	0,42 ± 0,10 (10) **
5-HIAA	3,07 ± 0,16	2,84 ± 0,04 **	3,21 ± 0,25 (10)	2,87 ± 0,14 (10) **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estándar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para el DOPAC (ver fig. 10 C), el MHPG (ver fig. 12 B), y el 5-HIAA (ver fig. 13 C). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estándar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA IV. CONCENTRACIONES BASALES Y TASA DE ACUMULACION DE 5-HTP EN EL GENICULADO LATERAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
0,15 ± 0,01	0,06 ± 0,01 *	2,44 ± 0,11 (8)	2,60 ± 0,24 (10)

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-30 minutos). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA V. CONCENTRACION DE DA Y DOPAC EN EL GENICULADO LATERAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	DA		DOPAC	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	0,37 ± 0,03	0,28 ± 0,03 *	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,06
Tratado	0,32 ± 0,02 £ (5)	0,32 ± 0,04 (4)	0,15 ± 0,03 ££ (5)	0,22 ± 0,03 (7) **

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

TABLA VI. CONCENTRACION DE NA Y NMN EN EL GENICULADO LATERAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	NA		NMN	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	1,79 ± 0,16	1,51 ± 0,04 *	0,26 ± 0,07	0,26 ± 0,02
Tratado	2,34 ± 0,07 ££ (5)	2,41 ± 0,12 ££ (5)	0,19 ± 0,02 (5)	0,21 ± 0,04 (6)

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

TABLA VII. CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIAA EN EL GENÍCULO LATERAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	5-HT		5-HIAA	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	2,83 ± 0,27	2,73 ± 0,10	3,07 ± 0,16	2,84 ± 0,04 *
Tratado	3,78 ± 0,34 ££ (5)	4,15 ± 0,71 ££ (6)	1,61 ± 0,06 ££ (5)	1,89 ± 0,27 ££ (4)

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p< 0,05; \*\* p< 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p< 0,05; ££ p< 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

### 3.1.2.3. ACTIVIDADES MAO A, MAO B Y RAZON MAO A/MAO

La actividad MAO A aumenta hasta el día 90, en el que se alcanza el máximo de actividad registrado. Después del día 90, la actividad desciende significativamente (-21,6%,  $p < 0,01$  entre los días 90 y 180), hasta alcanzar el mínimo valor observado a los 2 años de edad (fig. 7 A).

La actividad MAO B no presenta cambios significativos durante los primeros 90 días del desarrollo. A partir de este punto, hay un aumento significativo de actividad que alcanza el máximo observado a los 2 años de edad de la rata (fig. 8 A).

La razón MAO A/MAO B se mantiene sin cambios significativos entre los días 15 y 90, momento este en el que alcanza su máximo. Posteriormente, la razón desciende significativamente, alcanzando el mínimo valor observado a los 2 años de edad (fig. 9 A).

### 3.1.2.4. TASA DE ACUMULACION DE DA

La concentración basal de los animales viejos aumenta un 71,4% con respecto a la de los animales adultos ( $p < 0,01$ ). La acumulación de DA es lineal en los animales adultos y los viejos tras el tratamiento con pargilina (fig 14 A). La tasa de acumulación disminuye en los animales viejos un 53,8% con respecto al valor adulto ( $p < 0,01$ ; tabla VIII).

### 3.1.2.5. TURNOVER DE DOPAC

La concentración basal de los animales viejos disminuye un 20,8% con respecto a la de los animales adultos. El declinamiento de DOPAC es exponencial en los animales adultos y los viejos tras la adminis-

tración de pargilina (fig. 14 B). Los animales viejos muestran un aumento de la tasa fraccional (107,4%,  $p < 0,01$ ) y de la tasa de declinación (63,6%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los mismos parámetros de los animales adultos (tabla IX). Tras el tratamiento con probenecid, la acumulación de DOPAC fue lineal en ambos grupos (fig. 14 C). La tasa de acumulación de los animales viejos triplica el valor obtenido para los adultos ( $p < 0,01$ ; tabla X).

### 3.1.2.6. TASA DE ACUMULACION DE NA Y NMN

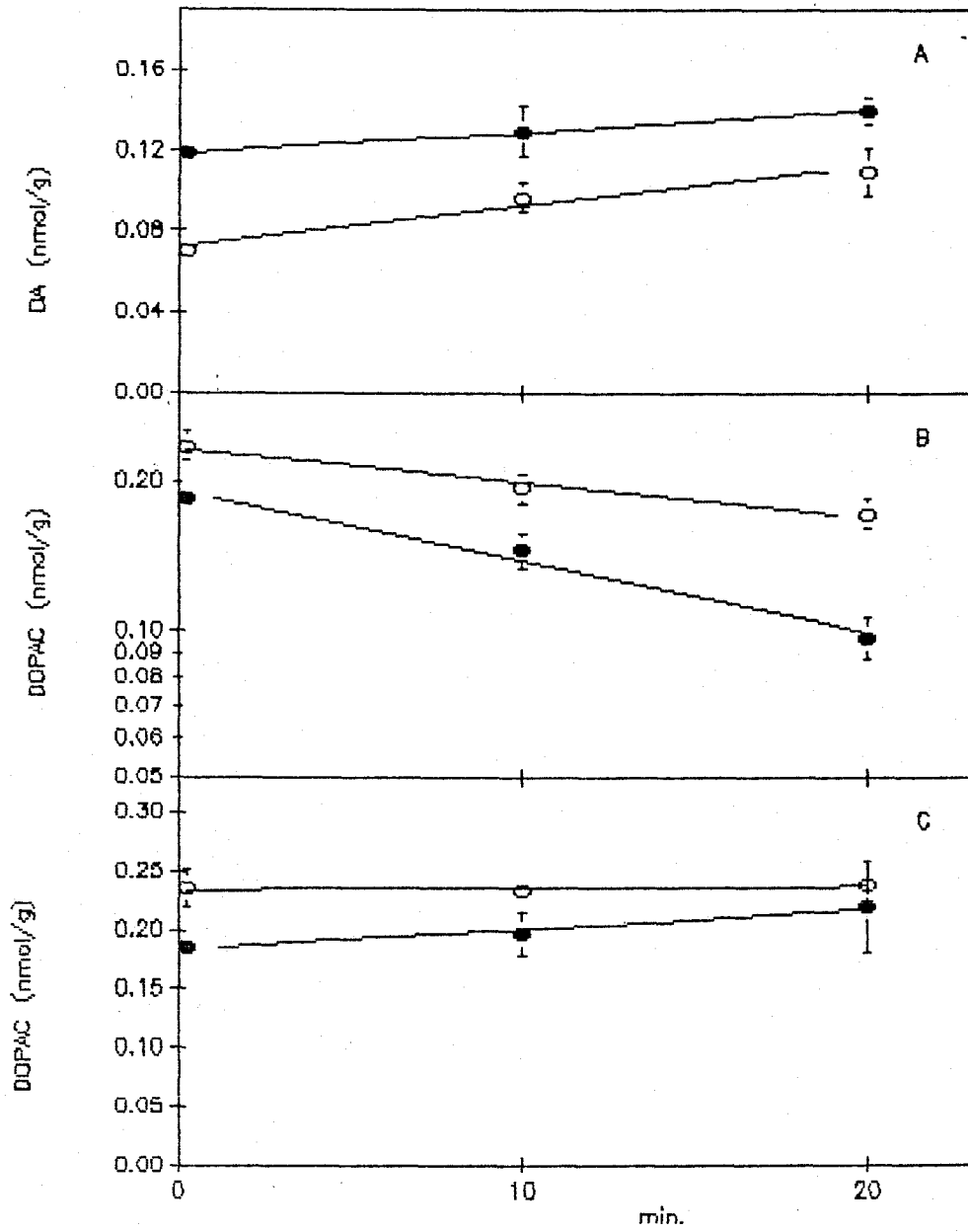
La acumulación de NA es lineal en los animales adultos y los viejos tras el tratamiento con pargilina (fig. 15 A). Ni la concentración en estado estacionario ni la tasa de acumulación muestran cambios significativos entre ambos grupos (tabla VIII). La concentración basal de NMN no muestra cambios entre los animales adultos y los viejos. La acumulación de NMN es lineal en ambos grupos tras el tratamiento con pargilina (fig. 15 B). La tasa de acumulación de los animales viejos disminuye un 66,7% ( $p < 0,01$ ) con respecto a la de los animales adultos (tabla VIII).

### 3.1.2.7. TURNOVER DE MHPG

Las concentraciones basales de MHPG son iguales en los animales adultos y los viejos. El declinamiento de MHPG es exponencial en ambos grupos tras la administración de pargilina (fig. 16 A). Los animales viejos muestran un incremento en la tasa fraccional (159,8%,  $p < 0,01$ ) y en la tasa de declinación (153,8%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los valores adultos (tabla IX). Tras el tratamiento con probenecid, la acumulación de MHPG es lineal en ambos grupos (fig. 16 B). La tasa de acumulación de los animales viejos aumenta un 80,0% con respecto al

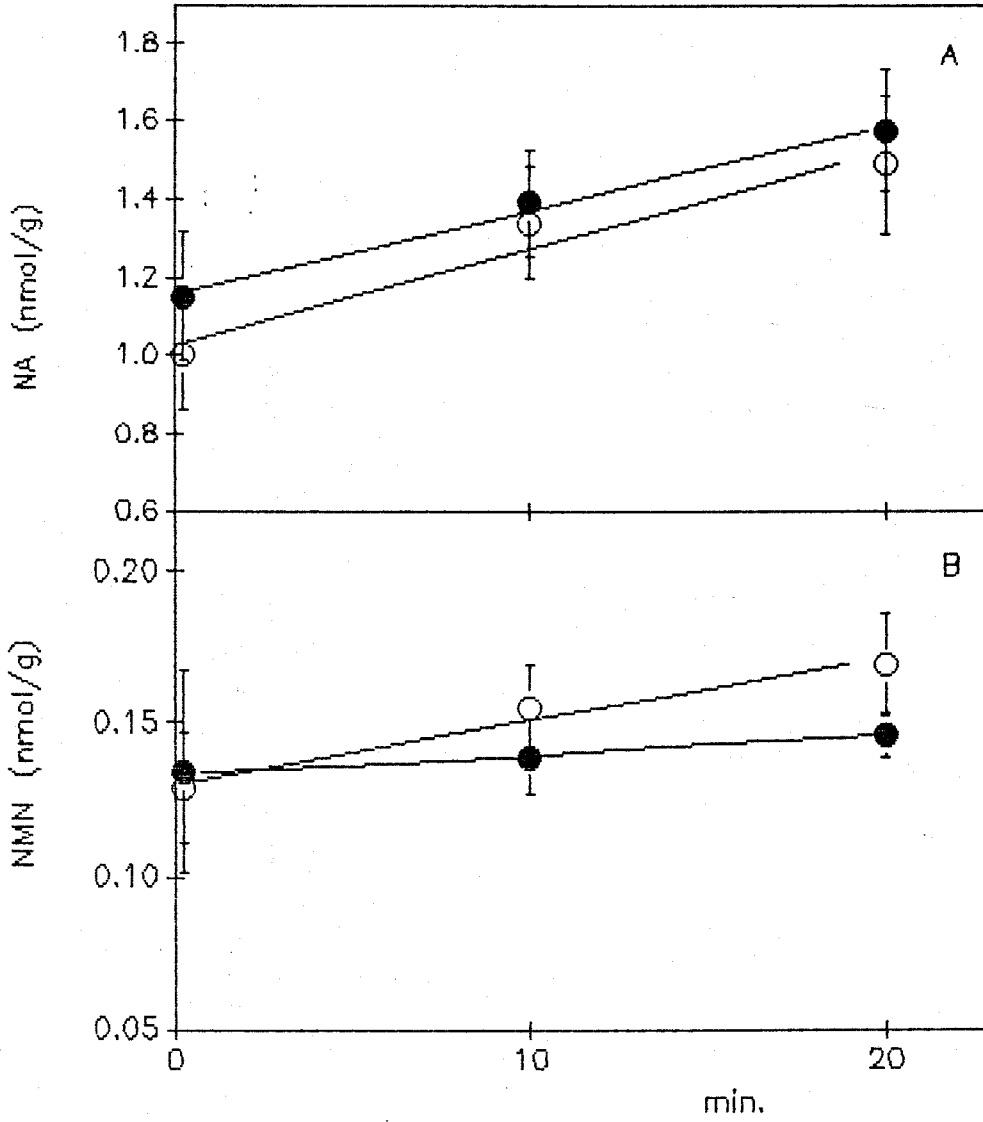


FIGURA 14



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de DA (A) y DOPAC (B), y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) sobre la concentración de DOPAC (C) en la corteza visual de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

FIGURA 15



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de NA (A) y NMN (B) en la corteza visual de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

valor adulto ( $p < 0,05$ ; tabla X).

#### 3.1.2.8. TASA DE ACUMULACION DE 5-HTP

La concentración basal de 5-HTP no es detectable ni en los animales adultos ni en los viejos. Tras la administración NSD-1015, la tasa de acumulación de los animales viejos (tabla XI) es un 27,3% mayor que la de los adultos ( $p < 0,01$ ).

#### 3.1.2.9. TASA DE ACUMULACION DE 5-HT

La concentración basal de 5-HT aumenta en los animales viejos un 42,6% con respecto a la de los animales adultos ( $p < 0,01$ ). La acumulación de 5-HT es lineal en ambos grupos tras la administración de pargilina (fig. 17 A). La tasa de acumulación de los animales viejos desciende un 53,1% con respecto al valor adulto ( $p < 0,01$ ; tabla VIII).

#### 3.1.2.10. TURNOVER DE 5-HIAA

La concentración de 5-HIAA en estado estacionario no experimenta cambios significativos entre los animales adultos y los viejos. Tras la administración de pargilina, el declinamiento de 5-HIAA es exponencial en ambos grupos (fig. 17 B). Los animales viejos muestran una disminución en la tasa fraccional (25,5%,  $p < 0,01$ ) y en la tasa de declinación (33,6%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los valores adultos (tabla IX). Tras la administración de probenecid (fig. 17 C), la tasa de acumulación de los animales viejos disminuye un 13,4% ( $p < 0,01$ ) con respecto a la de los adultos (tabla X).

### 3.1.2.11. CONCENTRACION DE DA Y DOPAC TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015

La concentración de DA no muestra cambios significativos ni en los animales adultos ni en los viejos con respecto a los animales controles. Por el contrario, la concentración de DOPAC en los animales tratados disminuye significativamente con respecto a los controles, siendo esta disminución del 29,2% ( $p < 0,01$ ) en los adultos y del 26,3% ( $p < 0,01$ ) en los viejos (tabla XII).

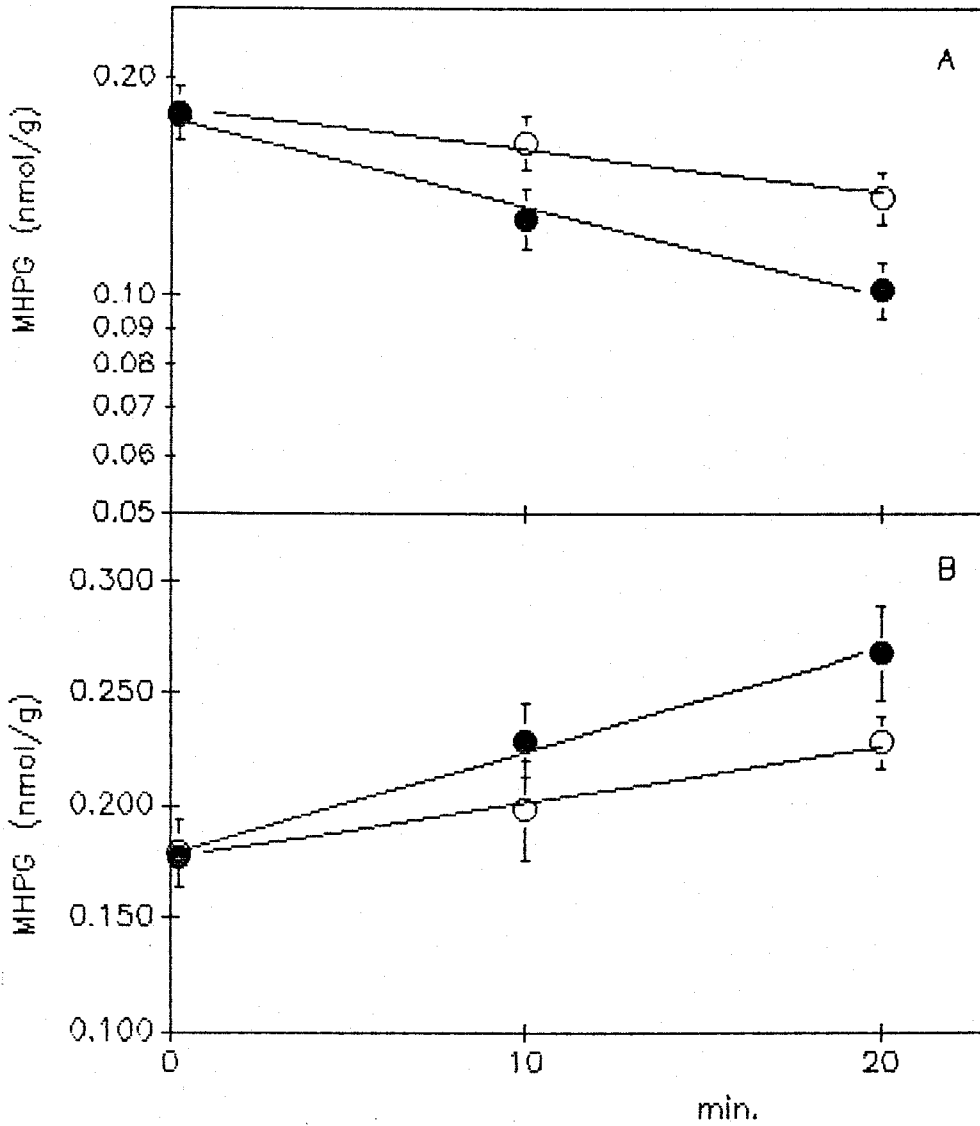
### 3.1.2.12. CONCENTRACION DE NA Y NMN TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015

Tras el tratamiento con NSD-1015, no se observan cambios significativos en la concentración de NA ni en los animales adultos ni en los viejos. La concentración de NMN no muestra cambios en los animales adultos tratados, pero sí sufre un incremento del 23,1% ( $p < 0,05$ ) en los animales viejos tratados con respecto a sus controles (tabla XIII).

### 3.1.2.13. CONCENTRACION DE 5-HT y 5-HIAA TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015

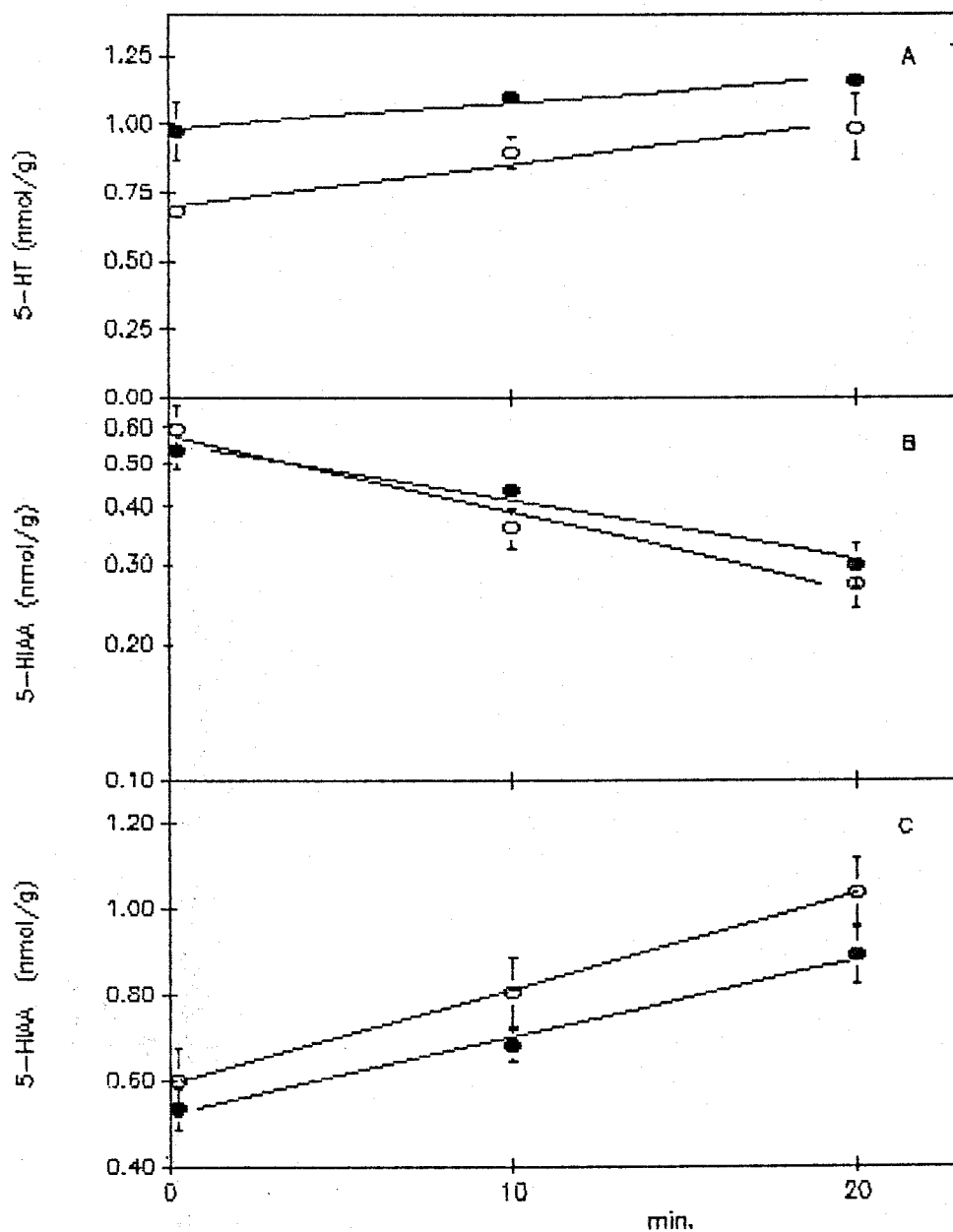
Tras la administración de NSD-1015, la concentración de 5-HT aumenta un 33,8% ( $p < 0,01$ ) en los animales adultos tratados, pero no muestra cambios significativos en los animales viejos tratados con respecto a sus controles. La concentración de 5-HIAA disminuye en ambos grupos de edad tras el tratamiento con NSD-1015, siendo esta disminución del 46,7% ( $p < 0,01$ ) y del 34,0% ( $p < 0,01$ ) en los animales adultos y viejos respectivamente (tabla XIV).

FIGURA 16



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) (A) y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) (B) sobre la concentración de MHPG en la corteza visual de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

FIGURA 17



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de 5-HT (A) y 5-HIAA (B), y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) sobre la concentración de 5-HIAA (C) en la corteza visual de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).



TABLA VIII .TURNOVER DE DA, NA, NMN Y 5-HT EN LA CORTEZA VISUAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PARGILINA.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DA	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,01 **	0,13 ± 0,02 (11)	0,06 ± 0,02 (10) **
NA	1,00 ± 0,13	1,15 ± 0,16	1,50 ± 0,29 (12)	1,57 ± 0,31 (12)
NMN	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,04 (10)	0,04 ± 0,03 (10) **
5-HT	0,68 ± 0,04	0,97 ± 0,11 **	0,96 ± 0,07 (12)	0,45 ± 0,19 (12) **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para la DA (ver fig. 14 A), la NA (ver fig. 15 A), la NMN (ver fig. 15 B) y la 5-HT (ver fig. 17 A). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA IX. TURNOVER DE DOPAC, MHPG Y 5-HIAA EN LA CORTEZA VISUAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PARGILINA.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Tasa fraccional ( $h^{-1}$ )		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DOPAC	0,24 ± 0,02	0,19 ± 0,01 **	0,94 ± 0,08 (10)	1,95 ± 0,10 (11) **	0,22 ± 0,03	0,36 ± 0,01 **
MHPG	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,82 ± 0,10 (11)	2,13 ± 0,24 (10) **	0,15 ± 0,03	0,38 ± 0,05 **
5-HIAA	0,60 ± 0,08	0,53 ± 0,05	2,35 ± 0,20 (12)	1,75 ± 0,15 (12) **	1,40 ± 0,31	0,93 ± 0,16 **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estándar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para el DOPAC (ver fig. 14 B), el MHPG (ver fig. 16 A) y el 5-HIAA (ver fig. 17 B). Las tasas fraccionales de turnover ( $h^{-1}$ ) son la pendiente ± la desviación estándar de la recta de regresión de los logaritmos naturales de la concentración de los metabolitos, calculadas para el número de puntos que figura entre paréntesis. Las tasas de turnover (nmol/g/h) se calculan multiplicando los valores de las concentraciones basales por las tasas fraccionales de turnover, y son la media ± la desviación estándar. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  cuando se comparan ratas adultas y viejas.



TABLA X. TURNOVER DE DOPAC, MHPG Y 5-HIAA EN LA CORTEZA VISUAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PROBENECID.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DOPAC	0,24 ± 0,02	0,19 ± 0,01 **	0,03 ± 0,02 (10)	0,10 ± 0,03 (10) **
MHPG	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,02 (11)	0,27 ± 0,02 (12) **
5-HIAA	0,60 ± 0,08	0,53 ± 0,05	1,34 ± 0,19 (12)	1,16 ± 0,12 (12) *

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estándar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para el DOPAC (ver fig. 14 C), el MHPG (ver fig. 16 B), y el 5-HIAA (ver fig. 17 C). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estándar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA XI. CONCENTRACIONES BASALES Y TASA DE ACUMULACION DE 5-HTP EN LA CORTEZA VISUAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
N.D	N.D	0,88 ± 0,09 (8)	1,12 ± 0,12 (10) **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-30 minutos). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  cuando se comparan ratas adultas y viejas. N.D: No detectado.

TABLA XII. CONCENTRACION DE DA Y DOPAC EN LA CORTEZA VISUAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	DA		DOPAC	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,01 **	0,24 ± 0,02	0,19 ± 0,01 **
Tratado	0,08 ± 0,01 (6)	0,14 ± 0,02 (9) *	0,17 ± 0,02 ££ (7)	0,14 ± 0,01 ££ (4) *

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

TABLA XIII. CONCENTRACION DE NA Y NMN EN LA CORTEZA VISUAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	NA		NMN	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	1,00 ± 0,13	1,15 ± 0,16	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,03
Tratado	0,85 ± 0,12 (6)	1,07 ± 0,17 (4) *	0,15 ± 0,01 (6)	0,16 ± 0,01 £ (8)

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

TABLA XIV. CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIAA EN LA CORTEZA VISUAL DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	5-HT		5-HIAA	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	0,68 ± 0,04	0,97 ± 0,11 **	0,60 ± 0,08	0,53 ± 0,05
Tratado	0,91 ± 0,08 ££ (8)	1,01 ± 0,08 (8) *	0,32 ± 0,04 ££ (8)	0,35 ± 0,04 ££ (8)

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

## **3.2. VIA EXTRAGENICULADA**

### **3.2.1. COLICULO SUPERIOR**

#### **3.2.1.1. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA**

La actividad Tirosina hidroxilasa aumenta durante desarrollo postnatal, con un incremento máximo entre los días 15 y 30 (51,3%,  $p < 0,01$ ; fig. 5 B).

#### **3.2.1.2. ACTIVIDAD TRIPTOFANO HIDROXILASA**

La fig. 6 B muestra el aumento de la actividad Triptófano hidroxilasa durante el desarrollo postnatal. El aumento máximo se da entre los días 90 y 180 (30,5%,  $p < 0,01$ ).

#### **3.2.1.3. ACTIVIDADES MAO A, MAO B Y RAZON MAO A/MAO B**

La actividad MAO A se mantiene sin cambios significativos durante el periodo comprendido entre los días 15 y 90, produciéndose a partir de este momento un descenso de actividad que es significativo entre los días 90 y 180 (-22.9%,  $p < 0,01$ ) y desde este momento hasta los 2 años (16%,  $p < 0,01$ ; fig. 7 B).

La actividad MAO B experimenta un aumento continuo desde el día 15 hasta el día 180, con incrementos significativos entre los días 30 y 90 (14,5%,  $p < 0,01$ ) y los días 90 y 180 (9,8%,  $p < 0,01$ ). Entre el día 180 y los 2 años de edad, tiene lugar un descenso de actividad (-12,0%,  $p < 0,01$ ; fig. 8 B).

La razón MAO A/MAO B no experimenta cambios significativos entre los días 15 y 90, pero sufre un descenso entre los días 90 y 180 (-30.14%,  $p < 0,01$ ), no habiendo cambios significativos entre los 180 días y los 2 años (fig. 9 B).

#### 3.2.1.4. TASA DE ACUMULACION DE DA

La DA muestra una acumulación no lineal a lo largo del intervalo de tiempo estudiado tras el tratamiento con pargilina (fig. 18 A). Por ello, hemos calculado dos tasas de acumulación diferentes correspondientes a los intervalos de tiempo 0-10 minutos y 10-20 minutos. En ambos intervalos, las tasas de acumulación de DA son mayores en los animales adultos que en los viejos ( $p < 0,01$ ), aunque no hay diferencias en las concentraciones en estado estacionario entre ambos grupos (Tabla XV).

#### 3.2.1.5. TURNOVER DE DOPAC

La declinación de DOPAC es exponencial en los animales adultos y en los viejos tras la administración de pargilina (fig. 18 B). Las concentraciones en estado estacionario aumentan en los animales viejos un 37,5% con respecto a los adultos ( $p < 0,01$ ), en tanto que la tasa fraccional disminuye en los animales viejos un 33,3% con respecto a los adultos ( $p < 0,05$ ). Las tasas de declinación son similares en los animales adultos y en los viejos (Tabla II). Tras la administración de probenecid, la acumulación de DOPAC es lineal en ambos grupos (fig. 18 C), no encontrándose diferencias entre las tasas de declinación de los animales adultos y los viejos (Tabla XVII).

#### 3.2.1.6. TASA DE ACUMULACION DE NA Y NMN

La NA muestra una acumulación lineal en los animales adultos y los viejos tras la administración de pargilina (fig. 19 A). Las concentraciones en estado estacionario no muestran cambios entre los animales adultos y los viejos, pero la tasa de acumulación de los animales

viejos disminuye un 58,5% con respecto al valor de los adultos ( $p < 0,01$ ). La acumulación de NMN, como la de NA, es lineal en los dos grupos a lo largo del tiempo (fig 19 B). Las concentraciones en estado estacionario no muestran diferencias entre los animales adultos y los viejos, aunque la tasa de acumulación de los animales viejos disminuyó un 33,9% con respecto al valor de los animales adultos ( $p < 0,01$ ; tabla XV).

#### 3.2.1.7. TURNOVER DE MHPG

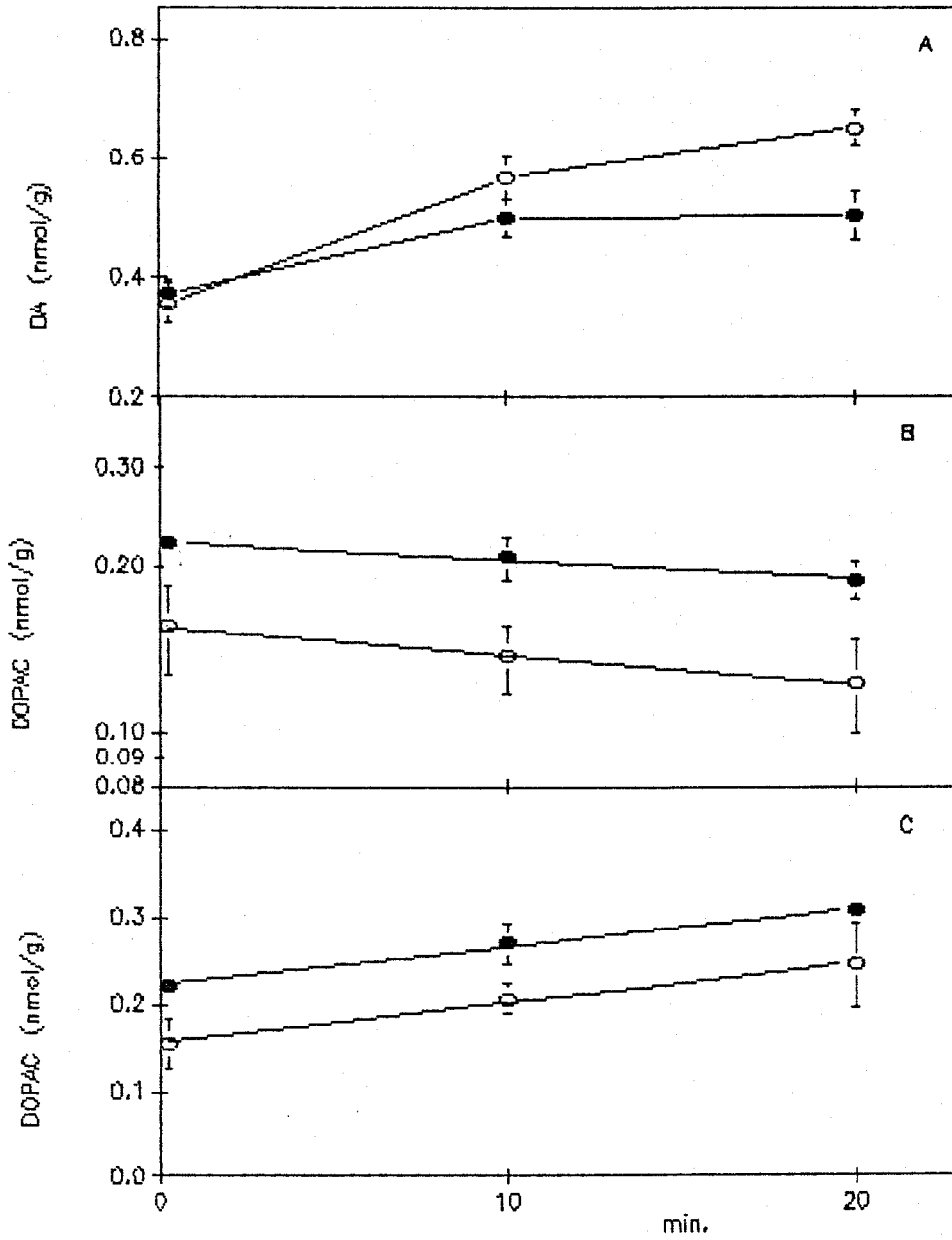
La declinación de MHPG es bifásica en ambos grupos después del tratamiento con pargilina (fig. 20 A). La concentración en estado estacionario de los animales viejos disminuye un 24,3% con respecto a la de los adultos ( $p < 0,01$ ). Hemos calculado dos intervalos de tiempo diferentes: 0-10 minutos y 10-20 minutos. En el primero, la comparación entre ambos grupos muestra una disminución en los animales viejos de la tasa fraccional (81,4%,  $p < 0,01$ ) y de la tasa de declinación (85,4%,  $p < 0,01$ ). En el segundo intervalo, la comparación de estos mismos parámetros no mostró diferencias entre los animales adultos y los viejos (Tabla XVI). Tras la administración de probenecid, la acumulación de MHPG es lineal en ambos grupos (fig. 20 B), disminuyendo la tasa de acumulación de los animales viejos un 29,7% con respecto a la tasa de los animales adultos ( $p < 0,01$ ; tabla XVII).

#### 3.2.1.8. TASA DE ACUMULACION DE 5-HTP

La concentración basal de 5-HTP no es detectable en los animales viejos. Tras la administración de NSD-1015, la tasa de acumulación no muestra diferencias significativas entre los animales adultos y los

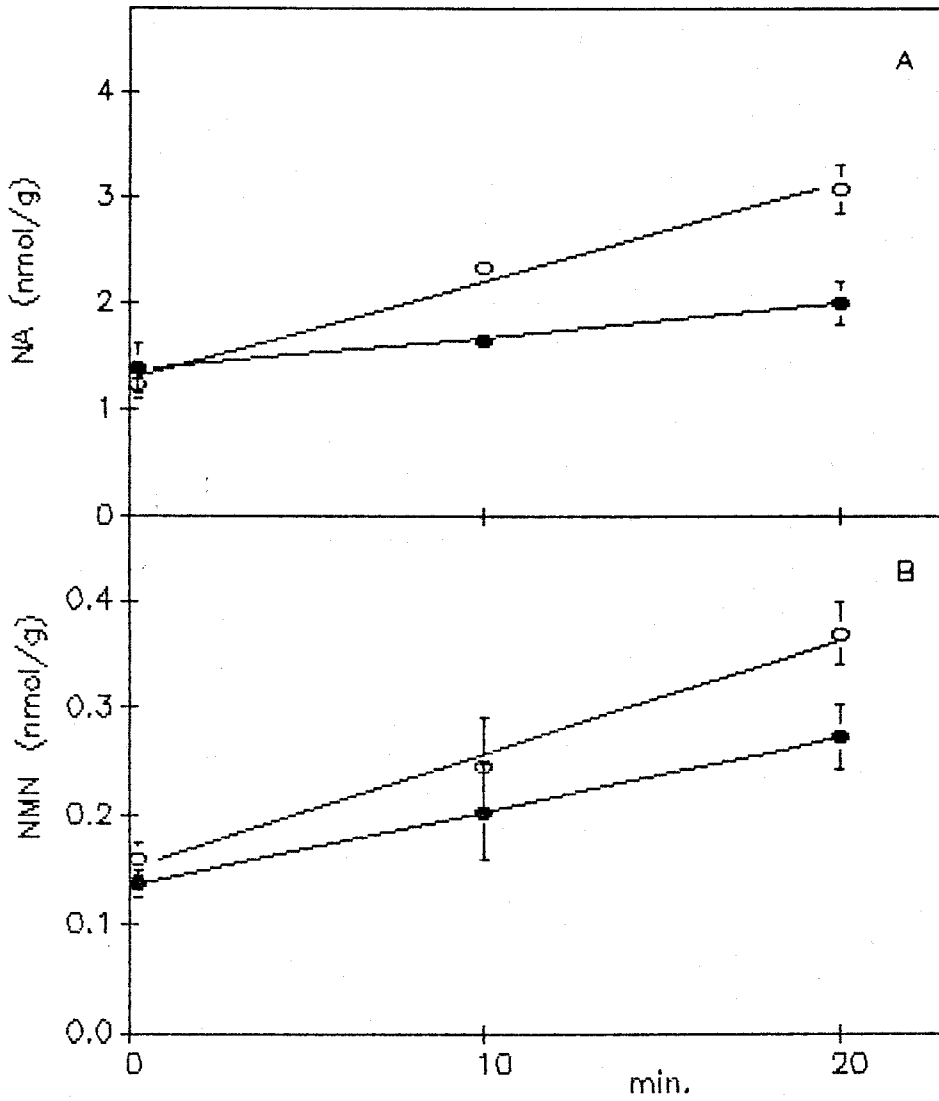


FIGURA 18



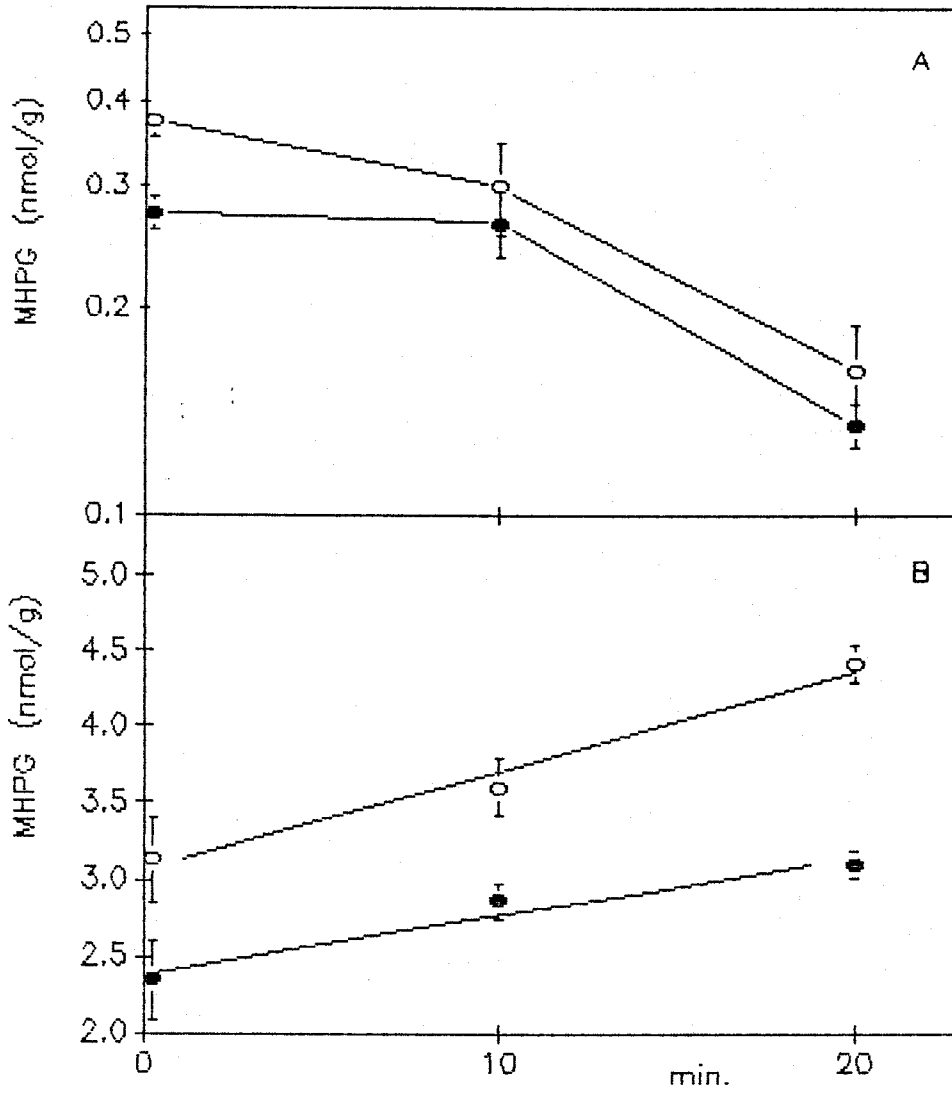
Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de DA (A) y DOPAC (B), y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) sobre la concentración de DOPAC (C) en el colículo superior de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

FIGURA 19



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de NA (A) y NMN (B) en el colículo superior de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

FIGURA 20



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) (A) y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) (B) sobre la concentración de MHPG en el colículo superior de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

viejos (tabla XIX).

#### 3.2.1.9. TASA DE ACUMULACION DE 5-HT

La acumulación de 5-HT es lineal en ambos grupos después del tratamiento con pargilina (fig. 21 A). La concentración en estado estacionario de los animales viejos disminuye un 32,2% con respecto a los adultos ( $p < 0,01$ ), pero no hay diferencias significativas entre las tasas de acumulación de ambos grupos (Tabla XV).

#### 3.2.1.10. TURNOVER DE 5-HIAA

La acumulación de 5-HIAA tras la administración de pargilina muestra diferencias entre los animales adultos y los viejos (fig. 21 B). La acumulación es bifásica en los animales adultos, en tanto que es lineal en los animales viejos. Hemos calculado dos intervalos de acumulación para los animales adultos: 0-10 minutos y 10-20 minutos. En el primero, la tasa fraccional y la tasa de declinación son similares a las calculadas para el intervalo único de los animales viejos. En el segundo intervalo, la tasa fraccional y la tasa de declinación son unas cinco veces mayores que las calculadas para el primer intervalo (Tabla XVI). Las concentraciones en estado estacionario son en los animales viejos un 24,9% menores que en los animales adultos ( $p < 0,01$ ). Tras la administración de probenecid, la acumulación de 5-HIAA es lineal en ambos grupos (fig. 21 C), siendo la tasa de acumulación de los animales viejos un 41,8% menor que la de los animales adultos ( $p < 0,01$ ; tabla XVII).

#### **3.2.1.11. CONCENTRACION DA Y DOPAC TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015**

Tras la administración de NSD-1015, la concentración de DA en los adultos tratados aumenta un 27.8% ( $p < 0,01$ ) con respecto a los adultos controles, y no muestra cambios entre los animales viejos tratados y controles. El tratamiento con NSD-1015 produce sobre las concentraciones de DOPAC un efecto opuesto al observado para DA, ya que los animales adultos tratados no muestran cambios con respecto a los adultos controles, y la concentración de DOPAC en los animales viejos tratados disminuye un 40,9% con respecto a la de los viejos controles (Tabla XIX).

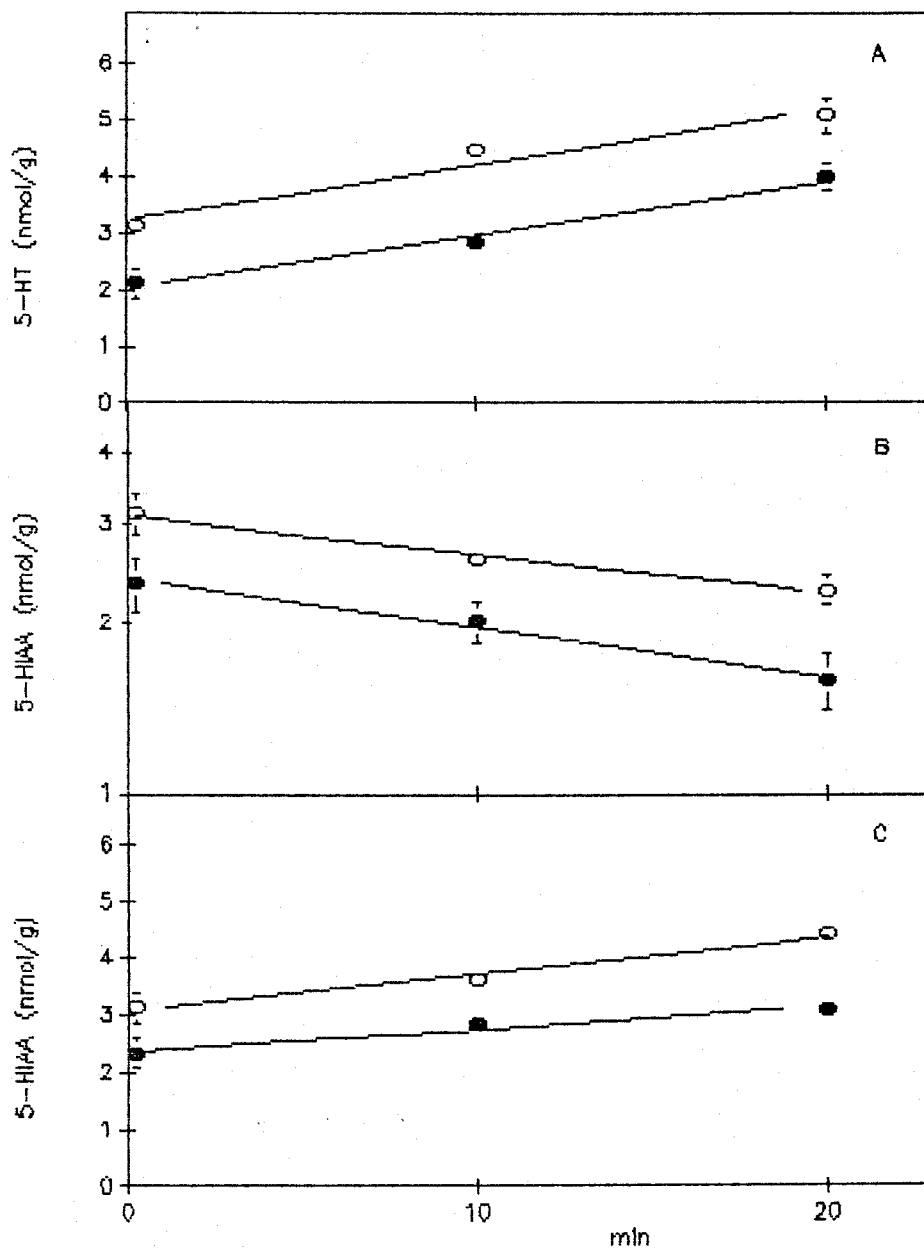
#### **3.2.1.12. CONCENTRACION DE NA Y NMN TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015**

Después de la administración de NSD-1015, la concentración de NA no experimenta cambios en los animales tratados, tanto adultos como viejos, con respecto a los animales controles. La concentración de NMN experimenta cambios en los animales tratados de las dos edades, aumentando en los animales adultos y viejos tratados un 43,8% ( $p < 0,01$ ) y un 35,7% ( $p < 0,01$ ) respectivamente (tabla XX).

#### **3.2.1.13. CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIAA TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015**

La administración de NSD-1015 produce un aumento en la concentración de 5-HT en los animales adultos (37,9%,  $p < 0,01$ ) y viejos (93,0%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los controles. La concentración de 5-HIAA disminuye en los animales tratados, observándose un descenso del 54,3% ( $p < 0,01$ ) y 35,3% ( $p < 0,01$ ) en los animales adultos y viejos respecti-

FIGURA 21



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de 5-HT (A) y 5-HIAA (B), y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) sobre la concentración de 5-HIAA (C) en el colículo superior de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

TABLA XV. TURNOVER DE DA, NA, NMN Y 5-HT EN EL COLICULO SUPERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PARGILINA.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DA	0,36 ± 0,03	0,37 ± 0,02	1,27 ± 0,16 (7)	0,76 ± 0,01 (10) **
			0,49 ± 0,19 (6)	0,02 ± 0,01 (10) **
NA	1,24 ± 0,14	1,39 ± 0,11	5,98 ± 0,42 (11)	2,48 ± 0,37 (12) **
NMN	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,62 ± 0,07 (9)	0,41 ± 0,01 (9) **
5-HT	3,14 ± 0,23	2,13 ± 0,26 **	6,04 ± 0,51 (15)	5,62 ± 0,61 (13)

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en dos intervalos para la DA (0-10 minutos y 10-20 minutos; ver fig. 18 A) y en un único intervalo (0-10-20 minutos) para la NA (ver fig. 19 A), la NMN (ver fig. 19 B) y la 5-HT (ver fig. 21 A). Las tasas de turnover son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA XVI. TURNOVER DE DOPAC, MHPG Y 5-HIAA EN EL COLICULO SUPERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PARGILINA.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Tasa fraccional ( $h^{-1}$ )		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DOPAC	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,01 **	0,69 ± 0,24 (10)	0,46 ± 0,01 (9) †	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,01
MHPG	0,37 ± 0,02	0,28 ± 0,01	1,29 ± 0,25 (7)	0,24 ± 0,04 (7) **	0,48 ± 0,12	0,07 ± 0,01 **
			3,72 ± 0,44 (7)	4,03 ± 0,84 (7)	1,38 ± 0,24	1,13 ± 0,28
5-HIAA	3,13 ± 0,27	2,35 ± 0,26	0,95 ± 0,24 (14)	1,19 ± 0,20 (14) **	2,98 ± 0,70	2,80 ± 0,78

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en dos intervalos para el MHPG (0-10 minutos y 10-20 minutos; ver fig. 20 A) y en un único intervalo (0-10-20 minutos) para el DOPAC (ver fig. 18 B), y el 5-HIAA (ver fig. 21 B). Las tasas fraccionales de turnover ( $h^{-1}$ ) son la pendiente ± la desviación estandar de la recta de regresión de los logaritmos naturales de la concentración de los metabolitos, calculadas para el número de puntos que figura entre paréntesis. Las tasas de turnover (nmol/g/h) se calculan multiplicando los valores de las concentraciones basales por las tasas fraccionales de turnover, y son la media ± la desviación estandar. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  cuando se comparan ratas adultas y viejas.



TABLA XVII. TURNOVER DE DOPAC, MHPG Y 5-HIAA EN EL COLICULO SUPERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PROBENECID.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DOPAC	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,01 **	0,27 ± 0,02 (8)	0,28 ± 0,01 (9)
MHPG	0,37 ± 0,02	0,28 ± 0,01 **	0,74 ± 0,09 (8)	0,52 ± 0,02 (8) **
5-HIAA	3,13 ± 0,27	2,35 ± 0,26 **	3,88 ± 0,41 (12)	2,26 ± 0,24 (12) **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para el DOPAC (ver fig. 18 C), el MHPG (ver fig. 20 B), y el 5-HIAA (ver fig. 21 C). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA XVIII. CONCENTRACIONES BASALES Y TASA DE ACUMULACION DE 5-HTP EN COLICULO SUPERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
0,12 ± 0,01	N.D	3,60 ± 0,62 (8)	3,56 ± 0,24 (10)

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-30 minutos). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p< 0,05; \*\* p< 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas. N.D: No detectado.

TABLA XIX. CONCENTRACION DE DA Y DOPAC EN EL COLICULO SUPERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	DA		DOPAC	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	0,36 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,01 **
Tratado	0,46 ± 0,03 ££ (10)	0,37 ± 0,03 (10) **	0,15 ± 0,02 (8)	0,13 ± 0,02 ££ (8) *

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

TABLA XX. CONCENTRACION DE NA Y NMN EN EL COLICULO SUPERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	NA		NMN	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	1,24 ± 0,14	1,81 ± 0,27 **	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Tratado	1,26 ± 0,07 (6)	1,75 ± 0,26 (8) **	0,23 ± 0,02 ££ (8)	0,19 ± 0,02 ££ (10) **

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

TABLA XXI. CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIAA EN EL COLICULO SUPERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	5-HT		5-HIAA	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	3,14 ± 0,23	2,13 ± 0,26 **	3,13 ± 0,27	2,35 ± 0,26 **
Tratado	4,33 ± 0,26 ££ (10)	4,11 ± 0,25 ££ (11)	1,43 ± 0,12 ££ (12)	1,52 ± 0,18 ££ (8)

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

vamente (tabla XXI).

### **3.2.2. TALAMO POSTERIOR**

#### **3.2.2.1. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA**

La actividad Tirosina hidroxilasa muestra un aumento durante el desarrollo postnatal, alcanzando el máximo observado a los 2 años de edad de la rata. Hay aumentos significativos entre los días 15 y 30 (63,5%,  $p < 0,01$ ) y entre los 90 y los 180 días (25,5%,  $p < 0,01$ ; fig 5 B).

#### **3.2.2.2. ACTIVIDAD TRIPTOFANO HIDROXILASA**

La actividad Triptófano hidroxilasa permanece sin cambios durante los primeros 90 días del desarrollo postnatal, observándose posteriormente un aumento significativo hasta los 180 días (55,5%,  $p < 0,01$ ; fig. 6B).

#### **3.2.2.3. ACTIVIDADES MAO A, MAO B Y RAZON MAO A/MAO B**

La actividad MAO A permanece sin cambios significativos durante los primeros 90 días de desarrollo postnatal. Posteriormente, hay descensos significativos entre los días 90 y 180 (-20,2%,  $p < 0,05$ ), y entre el día 180 y los 2 años (-15,0%,  $p < 0,01$ ; fig. 7B).

La actividad MAO B muestra un incremento a partir del día 90, con cambios significativos entre los días 30 y 90 (14,9%,  $p < 0,05$ ), 90 y 180 (18,3%,  $p < 0,01$ ) y 180 y 2 años (11,0%,  $p < 0,01$ ; fig. 8B).

La razón MAO A/MAO B permanece sin cambios significativos hasta el día 90. A partir de este momento hay un descenso significativo de la razón MAO A/MAO B, que alcanza el mínimo observado a los 2 años de

edad (fig. 9 B).

#### 3.2.2.4. TASA DE ACUMULACION DE DA

Las concentraciones basales de DA se mantienen sin cambios significativos entre los animales adultos y los viejos. La acumulación de DA es lineal en ambos grupos después del tratamiento con pargilina (fig. 22 A). La tasa de acumulación de los animales viejos disminuye un 13,2% con respecto a la de los animales adultos ( $p < 0,05$ ; tabla XXII).

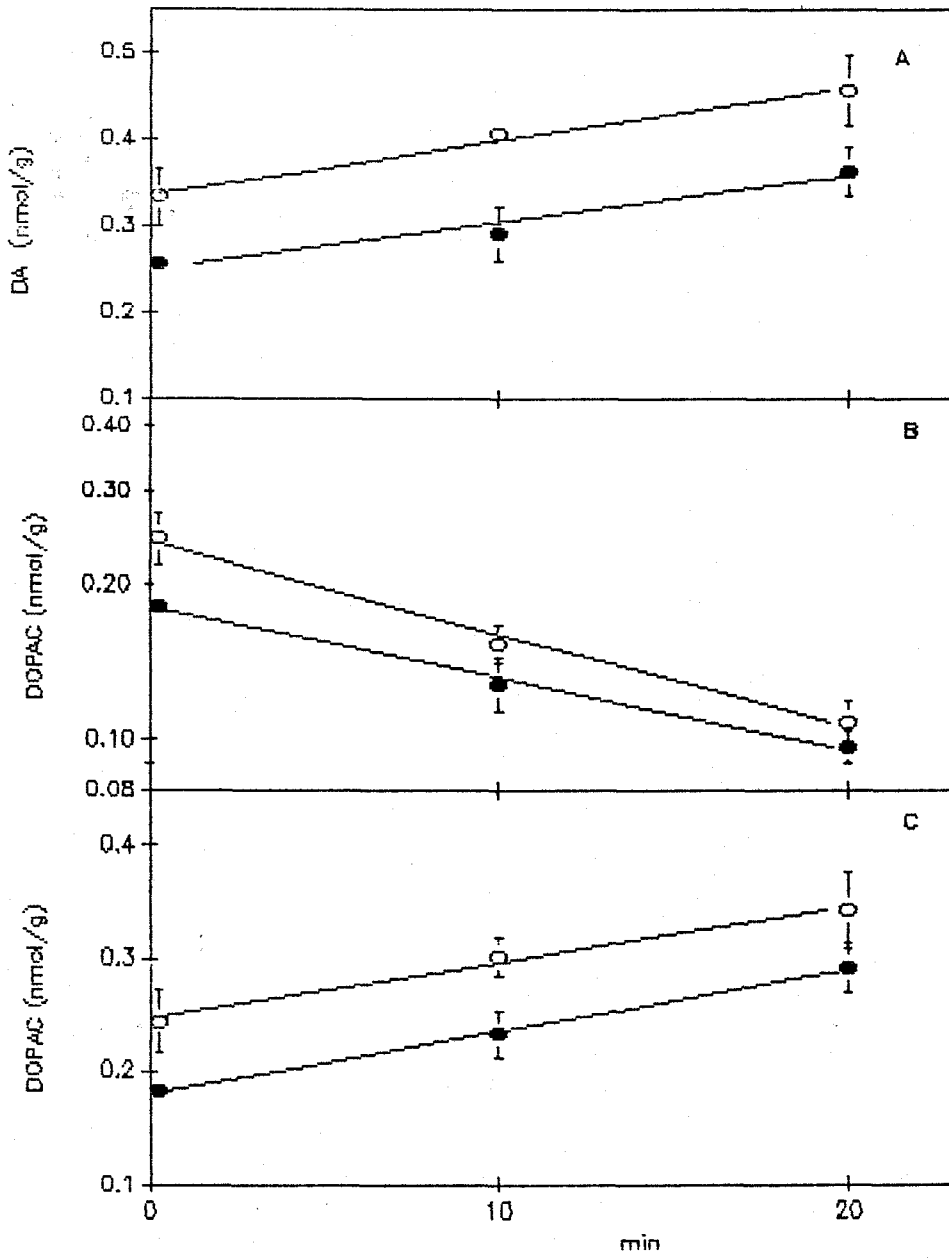
#### 3.2.2.5. TURNOVER DE DOPAC

La concentración en estado estacionario de los animales viejos disminuye un 25,0% con respecto a la de los adultos. Tras el tratamiento con pargilina, el declinamiento de DOPAC es exponencial en los animales adultos y los viejos (fig. 22 B), mostrando los animales viejos un decrecimiento significativo en su tasa fraccional de turnover (-14,5%,  $p < 0,01$ ) y en su tasa de declinación (-37,0%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los valores adultos (tabla II). Tras el tratamiento con probenecid, la acumulación de DOPAC es lineal en ambos grupos (fig. 22 C), observándose una disminución del 10,0% en la tasa de acumulación de los animales viejos con respecto a la de los controles adultos ( $p < 0,05$ ; tabla XXIV).

#### 3.2.2.6. TASA DE ACUMULACION DE NA Y NMN

Las concentraciones basales de NA son un 12,2% menores en los animales viejos que en los adultos ( $p < 0,01$ ). La acumulación de NA es lineal en ambos grupos tras el tratamiento con pargilina (fig. 23 A), observándose en los animales viejos una disminución del 15,2% en la

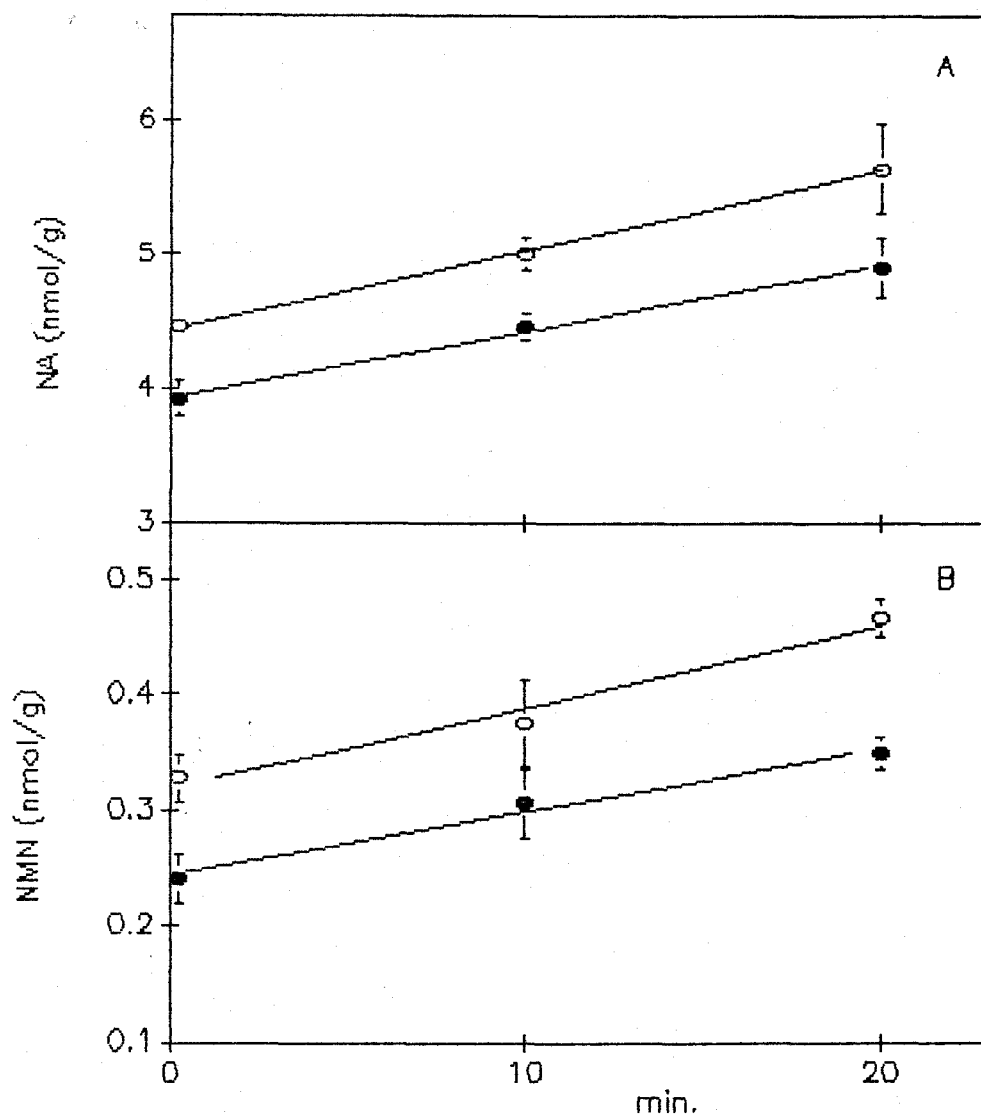
FIGURA 22



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de DA (A) y DOPAC (B), y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) sobre la concentración de DOPAC (C) en el tálamo posterior de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).



FIGURA 23



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de NA (A) y NMN (B) en el talamo posterior de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

tasa de acumulación con respecto al valor adulto ( $p < 0,01$ ; tabla XXII). La concentración basal de NMN en los animales viejos es un 23,3% menor que la de los animales adultos ( $p < 0,01$ ). La acumulación de NMN es lineal en ambos grupos tras el tratamiento con pargilina (fig. 23 B), observándose una disminución del 15,2% en la tasa de acumulación de los animales viejos con respecto al valor de los animales adultos ( $p < 0,01$ ; tabla XXII).

#### 3.2.2.7. TURNOVER DE MHPG

Las concentraciones de MHPG en estado estacionario son similares en los animales adultos y los viejos. Tras el tratamiento con pargilina, el declinamiento de MHPG es exponencial en ambos grupos (fig. 24 A). Los animales viejos muestran una disminución en la tasa fraccional (-28,4%,  $p < 0,01$ ) y en la tasa de acumulación (-31,7%) con respecto a los valores de los animales adultos (tabla XXIII). Tras la administración de probenecid, la acumulación de MHPG es lineal en ambos grupos (fig. 24 B) no observándose diferencias significativas entre las tasas de acumulación de los animales adultos y los viejos (tabla XXIV).

#### 3.2.2.8. TASA DE ACUMULACION DE 5-HTP

La concentración basal de 5-HTP es menor en los animales viejos que en los adultos (-60,0%,  $p < 0,01$ ). Tras el tratamiento con NSD-1015, la tasa de acumulación de los animales viejos disminuye un 37,4% con respecto a la de los animales adultos ( $p < 0,01$ ; tabla XXV).

#### 3.2.2.9. TASA DE ACUMULACION DE 5-HT

Las concentraciones de 5-HT en estado estacionario no muestran

diferencias significativas entre los animales adultos y los viejos. Tras el tratamiento con pargilina, la acumulación de 5-HT es lineal en ambos grupos (fig. 25 A), observándose un aumento de la tasa de acumulación en los animales viejos con respecto a los valores adultos (20,6%,  $p < 0,01$ ; tabla XXII).

#### 3.2.2.10. TURNOVER DE 5-HIAA

Las concentraciones de 5-HIAA en estado estacionario no muestran diferencias significativas entre los animales adultos y los viejos. Tras el tratamiento con pargilina, el declinamiento de 5-HIAA es exponencial en ambos grupos (fig. 25 B), mostrando los animales viejos un aumento en la tasa fraccional de turnover (25,4%,  $p < 0,01$ ) y en la tasa de declinación (21,1%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los valores adultos (tabla XXIII). Tras el tratamiento con probenecid, la acumulación de 5-HIAA es lineal en ambos grupos (fig. 25 C) observándose un 41,1% de aumento en la tasa de acumulación de los animales viejos con respecto a la de los adultos (tabla XXIV).

#### 3.2.2.11. CONCENTRACION DE DA Y DOPAC TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015

La concentración de DA disminuye en los animales adultos (-48,5%,  $p < 0,01$ ) y en los viejos (34,6%,  $p < 0,01$ ) tras la administración de NSD-1015. La concentración de DOPAC disminuye en los animales adultos tratados (29,2%,  $p < 0,01$ ), pero no sufre cambios significativos en los animales viejos con respecto a los controles no tratados (tabla XXVI).



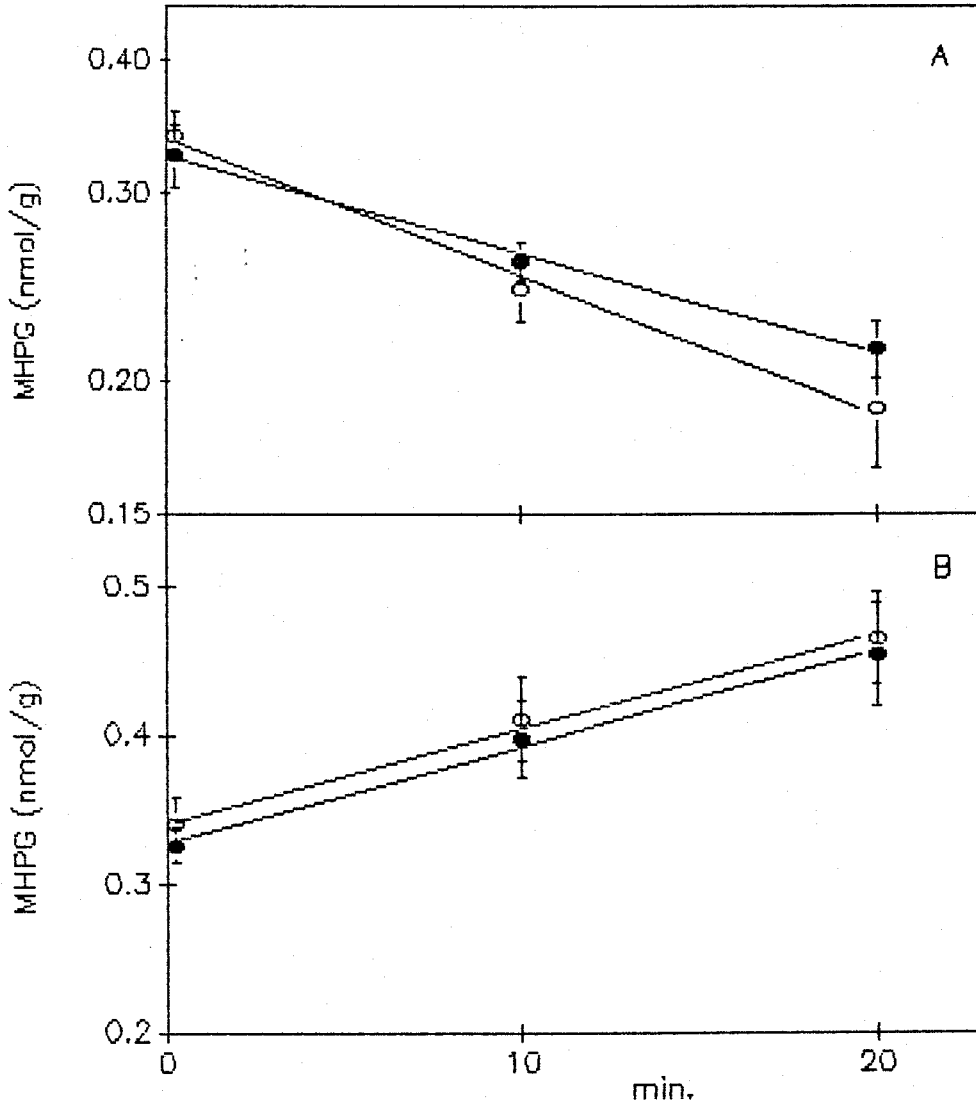
### 3.2.2.12. CONCENTRACION DE NA Y NMN TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015

La concentración de NA aumenta en los animales adultos (12,3%,  $p < 0,01$ ) y en los viejos (45,4%,  $p < 0,01$ ) tras la administración de NSD-1015. La concentración de NMN disminuye en los animales adultos (12,1%,  $p < 0,05$ ) y aumenta en los animales viejos (29,2%,  $p < 0,01$ ) tras el tratamiento con NSD-1015 (tabla XXVII).

### 3.2.2.13. CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIAA TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015

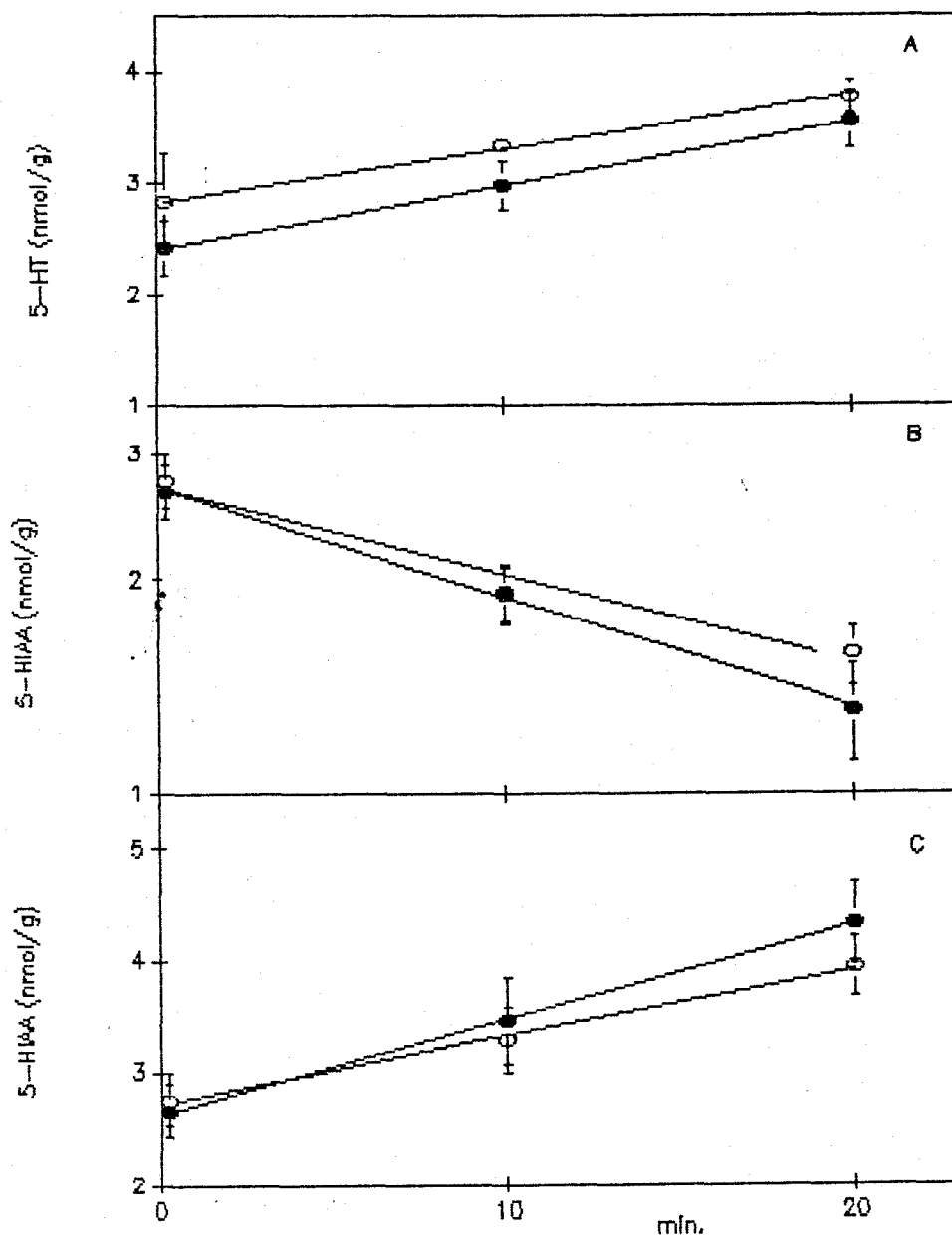
Tras la administración de NSD-1015, la concentración de 5-HT aumento en los animales adultos (44,7%,  $p < 0,01$ ) y en los animales viejos (23,3%,  $p < 0,01$ ) con respecto a los controles no tratados. Por el contrario, la concentración de 5-HIAA disminuye en ambas edades, siendo esta disminución de un 47,3% ( $p < 0,01$ ) en los animales adultos y de un 46,2% ( $p < 0,01$ ) en los animales viejos (tabla XXVIII).

FIGURA 24



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) (A) y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) (B) sobre la concentración de MHPG en el tálamo posterior de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

FIGURA 25



Efectos de la administración de pargilina (75 mg/Kg) sobre las concentraciones de 5-HT (A) y 5-HIAA (B), y de la administración de probenecid (250 mg/Kg) sobre la concentración de 5-HIAA (C) en el tálamo posterior de ratas adultas (círculos vacíos) y viejas (círculos rellenos).

TABLA XXII. TURNOVER DE DA, NA, NMN Y 5-HT EN EL TALAMO POSTERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PARGILINA.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DA	0,33 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,38 ± 0,07 (12)	0,33 ± 0,04 (12) *
NA	4,46 ± 0,10	3,92 ± 0,14 **	3,61 ± 0,40 (12)	3,06 ± 0,39 (11) **
NMN	0,33 ± 0,02	0,24 ± 0,02 **	0,43 ± 0,06 (11)	0,33 ± 0,05 (10) **
5-HT	2,82 ± 0,44	2,40 ± 0,24	2,91 ± 0,35 (12)	3,51 ± 0,30 (12) **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para la DA (ver fig. 22 A), la NA (ver fig. 23 A), la NMN (ver fig. 23 B) y la 5-HT (ver fig. 25 A). Las tasas de turnover son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA XXIII. TURNOVER DE DOPAC, MHPG Y 5-HIAA EN EL TALAMO POSTERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PARGILINA.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Tasa fraccional (h <sup>-1</sup> )		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DOPAC	0,24 ± 0,03	0,18 ± 0,01 **	2,20 ± 0,26 (10)	1,88 ± 0,20 (10) **	0,54 ± 0,13 (10)	0,34 ± 0,05 (10) **
MHPG	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,02	1,76 ± 0,17 (10)	1,26 ± 0,14 (11) **	0,60 ± 0,09 (10)	0,41 ± 0,07 (11) **
5-HIAA	2,75 ± 0,23	2,66 ± 0,24	1,69 ± 0,08 (12)	2,12 ± 0,09 (12) **	4,65 ± 0,62 (12)	5,63 ± 0,74 (12) **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para el DOPAC (ver fig. 22 B), el MHPG ( ver fig. 24 A) y el 5-HIAA (ver fig. 25 B). Las tasas fraccionales de turnover (h<sup>-1</sup>) son la pendiente ± la desviación estandar de la recta de regresión de los logaritmos naturales de la concentración de los metabolitos, calculadas para el número de puntos que figura entre paréntesis. Las tasas de turnover (nmol/g/h) se calculan multiplicando los valores de las concentraciones basales por las tasas fraccionales de turnover, y son la media ± la desviación estandar. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.



TABLA XXIV. TURNOVER DE DOPAC, MHPG Y 5-HIAA EN EL TALAMO POSTERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON PROBENECID.

Metab.	Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
DOPAC	0,24 ± 0,03	0,18 ± 0,01 **	0,30 ± 0,03 (10)	0,27 ± 0,03 (11) *
MHPG	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,38 ± 0,03 (11)	0,39 ± 0,04 (11)
5-HIAA	2,75 ± 0,23	2,66 ± 0,24	3,60 ± 0,39 (12)	5,08 ± 0,42 (12) **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-10-20 minutos) para el DOPAC (ver fig. 22 C), el MHPG (ver fig. 24 B), y el 5-HIAA (ver fig. 25 C). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA XXV. CONCENTRACIONES BASALES Y TASA DE ACUMULACION DE 5-HTP EN EL TALAMO POSTERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

Conc. basal (nmol/g)		Turnover (nmol/g/h)	
Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
0,15 ± 0,01	0,06 ± 0,01 *	1,46 ± 0,13 (9)	0,88 ± 0,12 (6) **

Las concentraciones basales (nmol/g) son la media ± desviación estandar de 4 animales independientes. El turnover se ha calculado en un único intervalo (0-30 minutos). Las tasas de turnover (nmol/g/h) son la pendiente ± desviación estandar de la recta de regresión calculada para el número de puntos que figura entre paréntesis. Cada punto representa a un animal. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan ratas adultas y viejas.

TABLA XXVI. CONCENTRACION DE DA Y DOPAC EN EL TALAMO POSTERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	DA		DOPAC	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	0,33 ± 0,03	0,26 ± 0,02 **	0,24 ± 0,03	0,18 ± 0,01 **
Tratado	0,17 ± 0,02 ££ (6)	0,17 ± 0,02 ££ (5)	0,17 ± 0,03 ££ (7)	0,17 ± 0,02 (5)

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

TABLA XXVII. CONCENTRACION DE NA Y NMN EN EL TALAMO POSTERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015.

	NA		NMN	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	4,46 ± 0,10	3,92 ± 0,04 **	0,33 ± 0,02	0,24 ± 0,02 **
Tratado	5,01 ± 0,41 £ (10)	5,70 ± 0,95 ££ (4)	0,29 ± 0,03 £ (8)	0,31 ± 0,02 ££ (8)

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

TABLA XXVIII. CONCENTRACION DE 5-HT Y 5-HIAA EN EL TALAMO POSTERIOR DE RATAS ADULTAS Y VIEJAS TRAS EL TRATAMIENTO CON NSD-1015

	5-HT		5-HIAA	
	Adulto	Viejo	Adulto	Viejo
Control	2,82 ± 0,44	2,40 ± 0,24 *	2,75 ± 0,23	2,66 ± 0,24
Tratado	4,08 ± 0,16 ££ (6)	2,96 ± 0,41 £ (6) **	1,45 ± 0,10 ££ (7)	1,43 ± 0,12 ££ (4)

El grupo problema fue tratado con NSD-1015 (75 mg/Kg) y sacrificado a los 30 minutos. El grupo control fue tratado con solución salina y sacrificado a los 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estandar de las concentraciones (nmol/g). El número de animales controles usado fue 4. El número de animales tratados figura entre paréntesis. Significación estadística (test t de Student): \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 cuando se comparan adultos y viejos. £ p < 0,05; ££ p < 0,01 cuando se comparan controles y tratados.

#### **4. DISCUSSION**

#### 4.1. ACTIVIDADES ENZIMATICAS

##### 4.1.1. TRIPTOFANO HIDROXILASA

La transformación de Trp en 5-HTP es considerada el paso limitante en la síntesis de 5-HT. Esta reacción está catalizada por la enzima TPH. Hemos medido la actividad TPH en las áreas de la vía visual durante el desarrollo postnatal de la rata. En general, todas las áreas muestran un mantenimiento o un aumento de la actividad a lo largo del desarrollo postnatal. Así, el geniculado lateral no presenta cambios significativos de actividad entre 1 y 6 meses de edad de la rata, mientras que el resto de las estructuras visuales muestra un incremento de actividad entre estas edades. Santiago y col., (1987) encontraron que los niveles de 5-HT aumentaban en el geniculado lateral y el colículo superior, pero no en el tálamo posterior ni en la corteza visual. Esta discordancia entre los niveles de la actividad TPH y las concentraciones de la 5-HT no es extraña en tanto que la TPH *in vivo* no está saturada por su sustrato, y la cantidad de enzima no parece ser, en principio, el factor limitante de la síntesis de 5-HT (Boadle-Biber, 1982). Teniendo en cuenta estos datos, podemos apuntar hacia una regulación *in vivo* de la actividad TPH independientemente de factores tales como la cantidad total de enzima disponible, como ha sido sugerido por varios autores (Hamon y col., 1978; Kuhn y col., 1978; Kuhn y col., 1980; Hamon y col., 1981).

##### 4.1.2. TIROSINA HIDROXILASA

La tirosina hidroxilasa es propuesta habitualmente como enzima limitante de la síntesis de catecolaminas (Levitt y col., 1965). En las estructuras de la vía visual, la TH muestra un perfil de actividad

muy claro, con un aumento continuo durante todo el desarrollo postnatal. Los valores de actividad son muy similares en las cuatro estructuras estudiadas. Este aumento de actividad durante el desarrollo coincide con un aumento de los niveles de DA *in vivo* en el colículo superior y en el tálamo posterior, pero no en el geniculado lateral ni en la corteza visual (Santiago y col., 1989). La literatura existente sobre la actividad TH muestra datos opuestos, ya que se ha informado de aumento, mantenimiento y descenso de la actividad en diferentes áreas cerebrales (McGeer y McGeer, 1976; Reis, 1977; Algeri y col., 1977). Esta diversidad en los datos puede ser un reflejo de las diferentes condiciones de ensayo utilizadas por los distintos autores (Joh y col., 1986), lo que significaría que la medida de la actividad enzimática *in vitro* no sería un buen parámetro para la valoración de su actividad *in vivo*. Por otra parte, existen diferentes mecanismos de regulación de la actividad TH, tanto a corto (Atkinson y col., 1987) como a largo plazo (Lewis y col., 1987) que pueden estar modificando la actividad de la enzima.

#### 4.1.3. MONOAMINO OXIDASA

La degradación de serotonina y catecolaminas es catalizada por la MAO. Se asume que la enzima MAO existe en varias formas (Collins y col., 1970; Yang y Neff, 1973). Las que adquieren mayor interés para nosotros son las formas A y B, ya que la primera parece catalizar preferentemente la desaminación de 5-HT y NA (Yang y Neff, 1974; Yu, 1986) en tanto que la segunda cataliza la degradación de DA (Yu, 1986). El perfil de desarrollo y los valores de la actividad MAO A son muy similares en las cuatro estructuras de la vía visual. A los 15



días de edad de la rata, la enzima presenta ya sus valores adultos, y se mantiene sin cambios hasta los tres meses de edad. La actividad MAO A disminuye desde este momento, observándose su actividad mínima a los dos años de edad. La actividad es significativamente menor en el animal viejo que en el adulto en todas las estructuras estudiadas. Estas observaciones están de acuerdo con las de otros autores (Mackay y col., 1978). El descenso generalizado de la actividad MAO A encontrado en las estructuras de la vía visual no muestra una buena correlación con las concentraciones de los productos de su catálisis. Así, los niveles de 5-HIAA descienden durante el desarrollo y el envejecimiento en el tálamo posterior y en la corteza visual, y se mantienen sin cambios significativos en el colículo superior y en el geniculado lateral, mientras que los niveles de MHPG permanecen sin cambios significativos durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento en todas las estructuras de la vía visual (Santiago y col., 1989). La actividad MAO A en el cerebro es fundamentalmente intraneuronal (Jarrott e Iversen, 1971), y su descenso puede ser un índice de la pérdida de actividad neuronal. Sin embargo, la actividad MAO A no parece ser limitante en el cerebro, por lo cual este descenso de la actividad durante el envejecimiento puede que no tenga repercusiones sobre la degradación de las monoaminas.

La actividad MAO B muestra un aumento constante durante todo el desarrollo postnatal y el envejecimiento en todas las estructuras de la vía visual excepto en el colículo superior, en el que desciende entre los 6 meses y los 2 años de edad. Este aumento de la actividad ha sido descrito en otras áreas cerebrales (Gottfries y col., 1974; Venero y col., 1989). Como se ha discutido previamente para la MAO A, el perfil de la actividad MAO B no coincide en todas las áreas de la

vía visual con la evolución de la concentración de los productos derivados de su actividad, ya que el DOPAC sólo muestra aumentos en su concentración en la corteza visual y en el colículo superior, en tanto que en el tálamo posterior y en el geniculado lateral permanece sin cambios (Santiago, 1989).

La actividad MAO B, al contrario que la MAO A, parece estar situada en la glia (Yu, 1986). Es sabido que la glía aumenta durante todo el desarrollo y el envejecimiento, lo cual podría explicar el aumento de la actividad MAO B encontrado por nosotros y otros autores (Robinson y col., 1977; Venero y col., 1989).

El índice entre las actividades MAO A y MAO B muestra que la actividad MAO predominante en las estructuras de la vía visual es la MAO A. Este índice se mantiene sin cambios significativos hasta los tres meses de desarrollo postnatal, y desciende posteriormente hasta el envejecimiento. La disminución de este índice se debe al descenso de la actividad MAO A junto con un aumento de la actividad MAO B. Estos datos están de acuerdo con el ya mencionado aumento de la glía durante el envejecimiento y la pérdida de capacidad metabólica en algunos de los sistemas neuronales. Como ya se ha discutido previamente, parece que ninguna de las dos formas de actividad MAO es limitante in vivo, con lo que el descenso de este índice puede no tener unas repercusiones importantes en el metabolismo de las monoaminas. No obstante, hay que tener en cuenta que algunas sustancias inhibitoras de la actividad MAO se han empleado como fármacos en el tratamiento de desórdenes depresivos. Estos fármacos se administran en principio como inhibidores de la actividad MAO A con el objetivo de aumentar las concentraciones endógenas de 5-HT. La alteración de la actividad MAO

durante el envejecimiento, con el ya mencionado descenso del índice MAO A/MAO B, puede alterar la sensibilidad de los sistemas neuronales hacia estos compuestos. Es ya conocido que los individuos viejos muestran una alteración en la respuesta hacia los fármacos (Bender, 1970; Kent, 1976; Beck, 1978). Este conjunto de datos apunta hacia la necesidad de una correcta evaluación en los individuos de edad avanzada de la situación metabólica de los sistemas neuronales implicados en estos desórdenes y sometidos a este tipo de tratamientos.

## **4.2. TURNOVER DE AMINAS BIOGENAS**

### **4.2.1. VIA GENICULADA**

Nuestro estudio muestra cambios relacionados con la edad de las monoaminas en las estructuras de la vía visual geniculada (geniculado lateral y corteza visual). Se dispone de pocos datos sobre los cambios de las monoaminas relacionados con la edad en estas estructuras. Es necesario recordar que al menos el 50% de las células ganglionares (células de la retina cuyos axones conforman el nervio óptico) emiten proyecciones que alcanzan al núcleo geniculado (Linden y Perry, 1983). Además, ha sido puesta de manifiesto la existencia de una degeneración retiniana en el envejecimiento (Cano y col., 1986). Por lo tanto, durante el envejecimiento cabría esperar cambios en los circuitos del geniculado. Algunos trabajos previos realizados en nuestro departamento (Santiago y col., 1987; Santiago y col., 1989) mostraron que estos cambios son relativamente escasos. Esto puede deberse al hecho de que la transmisión en el núcleo geniculado está fuertemente modulada. Además, el núcleo geniculado recibe una serie de aferencias que en conjunto superan largamente en número a las terminales procedentes de la retina (Guillery, 1967). No se conoce bien la función de las pro-

yecciones masivas desde la corteza visual al geniculado. La capá VI de la corteza visual envía proyecciones al geniculado lateral que superan en número total de fibras a las proyecciones de geniculado a corteza. Además, los campos visuales de las neuronas del geniculado difieren poco de las correspondientes retinianas. De hecho, no sólo el geniculado lateral sino el resto de las estructuras de la vía visual presentan una organización retinotópica. Ya que la función de estas proyecciones corticofugales no está clara, se ha propuesto que el geniculado actúa sólo como una estación de relevo entre la retina y la corteza visual. Por el contrario, se ha propuesto también que la complejidad de los circuitos neuronales del geniculado puede ser una prueba de que esta estructura lleva a cabo un complejo procesado de la información visual procedente de la retina (Koch, 1987).

El envejecimiento no parece tener un efecto uniforme sobre las estructuras de la via geniculada, ya que los niveles de las aminos biógenas muestran más cambios en la corteza visual que en el núcleo geniculado. Así, los niveles basales de DA son bajos en ambas estructuras, siendo más bajos en la corteza visual que en el geniculado. Nosotros encontramos unos valores de la razón NA/DA en ambas estructuras (4.8 en geniculado y 14.3 en corteza visual) que son compatibles con la presencia de la DA como precursor de la NA. Sin embargo, los cambios observados en la DA y la NA durante el envejecimiento no son paralelos. Esto parece indicar que la DA, a parte de ser el precursor de la NA, podría tener por sí misma algún papel fisiológico en la vía visual, tal y como ha sido sugerido por otros autores (Reader y col., 1976; Saldade y Orrego, 1977; Phillipson y col., 1987). Además, la formación de DOPAC en la corteza visual podría ser reflejo de una



inervación dopaminérgica (Westerink y DeVries, 1985). Sin embargo, el hecho de que estas terminales dopaminérgicas sean relativamente escasas en número podría otorgar a la DA un papel más modulador que de verdadero neurotransmisor, como se ha sugerido en la retina. En esta estructura, la DA actúa controlando la transmisión entre las células horizontales. Las sinapsis que tienen lugar entre estas células son de tipo eléctrico. La acción moduladora de la DA sobre este tipo de sinapsis permite a la retina realizar un procesamiento previo de la información visual antes de que las células ganglionares la envíen al núcleo geniculado. Existe un cuerpo de datos bastante sólido que sugiere que en la corteza visual la DA podría participar en las funciones visuales formando parte de un circuito de retroinhibición que regularía la actividad aferente del geniculado (Nauta y col., 1954; Lund y col., 1975; Updyke, 1977; Sefton y col., 1981; Gilbert, 1983). En la corteza visual de los animales viejos, la concentración de DA llega casi a duplicar la que se encuentra en los animales adultos. Sin embargo, las medidas del turnover de DA tras el tratamiento con pargilina muestran que este es menor en el animal viejo que en el adulto. El DOPAC muestra un comportamiento opuesto, ya que si bien la concentración basal es mayor en los adultos, tanto la tasa fraccional como la tasa de turnover son significativamente mayores en los viejos tras el tratamiento con pargilina. Como ya hemos comentado, nuestros datos muestran también un aumento de la actividad MAO B en esta estructura a lo largo del envejecimiento. Este conjunto de datos parece sugerir un aumento de la degradación de DA a través de DOPAC. El turnover de DOPAC medido tras la administración de probenecid parece apuntar también en este sentido. Así, la tasa de acumulación de DOPAC es mayor en la corteza visual de los animales viejos que en la de los animales

adultos, lo que sugeriría una mayor eliminación directa de DOPAC, es decir, sin ser degradado hasta HVA.

El geniculado lateral muestra un comportamiento opuesto al de la corteza visual, con una disminución significativa en la tasa de acumulación de DOPAC de los animales viejos tras el tratamiento con probenecid. En este núcleo, la tasa fraccional de turnover del DOPAC tras la administración de pargilina es menor en los animales viejos que en los adultos, aunque la tasa de turnover no experimenta cambios significativos. De esto y de los datos de turnover de DA, puede deducirse un cierto enlentecimiento de la vía dopaminérgica en el núcleo geniculado. Este comportamiento opuesto de la vía dopaminérgica en dos estructuras tan interrelacionadas funcionalmente parece estar de acuerdo con la participación de la DA en un circuito de retroinhibición que controlaría la actividad de estas dos estructuras, principalmente del núcleo geniculado lateral. Esta alteración del turnover de DA en los animales viejos puede tener repercusiones sobre las funciones en las cuales la DA parece tener participación. Así, el circuito de retroinhibición antes mencionado podría verse afectado en los animales viejos por un flujo menor de DA. Este descenso en el turnover de DA no tiene paralelismo con el de la NA, lo cual puede apoyar la idea de que la DA tiene, al menos en la corteza visual, un papel fisiológico independiente de su utilización como precursor de la NA.

En contraste con las bajas concentraciones de la DA, la NA muestra altas concentraciones en ambas estructuras. En el núcleo geniculado, la concentración basal de NA es inferior en los animales viejos que en los adultos. En la corteza visual, las concentraciones basales son similares en ambos grupos. El turnover de NA tampoco muestra

diferencias entre los animales adultos y los viejos en ninguna de estas dos estructuras. Sin embargo, durante el envejecimiento tanto el turnover del MHPG (el principal metabolito de la NA) como la razón MHPG/NA disminuyen en el núcleo geniculado y aumentan en la corteza visual, lo cual podría indicar una alteración relacionada con la edad del metabolismo de la NA. La NA juega un papel importante en la plasticidad de la corteza visual (Sillito, 1986), y ha sido propuesta como neuromodulador cortical (Reader, 1978; Woodward y col., 1979). Es sabido que la corteza estriada proyecta hacia el geniculado esencialmente a través de las células piramidales (Lund y col., 1975). Así mismo, las células piramidales son la diana principal del sistema noradrenérgico en la corteza visual. Por lo tanto, en el geniculado hay una influencia noradrenérgica a través de la corteza visual. Los cambios plásticos en la corteza visual en los que interviene la NA podrían influir sobre los neurotransmisores que se encuentran en el núcleo geniculado. Además, la NA ejerce un papel modulador, modificando la respuesta de las células diana a otros impulsos (Rogawski y Aghajanian, 1980a). La transmisión nerviosa del geniculado recibe una poderosa influencia moduladora por parte de la inervación noadrenérgica procedente del locus coeruleus. La NA parece tener un efecto inhibitor sobre las interneuronas, debido fundamentalmente a una modificación en la capacidad de respuesta de estas células. Por tanto, estos cambios en el metabolismo de la NA pueden modificar el control ejercido por esta monoamina. Como se ha mencionado previamente para la DA, las dos estructuras de la vía visual muestran un comportamiento opuesto en las modificaciones relacionadas con la edad del turnover de NA y sus metabolitos, lo que apoyaría el papel de molécula moduladora que se atribuye a la NA en estas estructuras.

La 5-HT se encuentra en concentraciones altas tanto en el geniculado como en la corteza visual. En los animales viejos, el metabolismo de la 5-HT muestra más cambios en la corteza visual que en el geniculado. En la corteza visual, el nivel basal de 5-HT es superior en los animales viejos que en los adultos, pero el turnover de 5-HT muestra el comportamiento opuesto, siendo superior en los animales adultos que en los viejos. Este comportamiento opuesto entre los cambios en el nivel basal y el turnover de 5-HT que se observa en la corteza visual de los animales viejos al compararlos con el de los adultos, parece deberse al aumento de la síntesis de 5-HT junto con un descenso de su degradación. El aumento de la síntesis de 5-HT se confirma siguiendo el perfil de la actividad TPH durante el desarrollo postnatal. Como ya se ha discutido previamente, la actividad de esta enzima aumenta durante todo el periodo de tiempo estudiado. En edades posteriores (2 años), la tasa de síntesis de 5-HT se mide mediante la tasa de acumulación del 5-HTP tras el uso de NSD-1015, encontrándose que la tasa de acumulación de los animales viejos es significativamente mayor que la de los adultos. El descenso de la degradación puede encontrar apoyo experimental en la medida de la actividad MAO A. Esta enzima, clave en la degradación de la 5-HT, muestra un descenso en su actividad a lo largo del desarrollo postnatal, con el mínimo de actividad observado a los 2 años. Este punto se ve confirmado por el comportamiento del 5-HIAA, ya que aunque sus concentraciones basales no presentan cambios entre adultos y viejos, su turnover sí es inferior en estos últimos, ya que descienden tanto la tasa fraccional como la tasa de turnover tras el tratamiento con pargilina como su tasa de turnover tras el tratamiento con probenecid.



En el núcleo geniculado, la concentración basal de 5-HT no muestra cambios con el envejecimiento, y tampoco lo hace su turnover. El mantenimiento de la síntesis de 5-HT se ve reflejado en el perfil de desarrollo de la TPH, la cual, como se ha discutido anteriormente, no muestra un aumento significativo a lo largo del desarrollo. Tampoco la tasa de acumulación de 5-HTP tras el tratamiento con NSD-1015 presenta cambios significativos durante el envejecimiento. Este mantenimiento del metabolismo de 5-HT se ve confirmado al analizar el comportamiento del 5-HIAA. Así, sólo la concentración basal de este compuesto muestra cambios (concretamente una disminución) en los animales viejos. El turnover de 5-HIAA no presenta cambios entre ambos grupos. Como hemos discutido previamente, esto parece entrar en contradicción con la observada disminución de la actividad MAO A en esta estructura. Sin embargo, esta contradicción puede ser tan sólo aparente, ya que como hemos mencionado anteriormente, la actividad MAO A no parece ser un paso limitante en la degradación de la 5-HT. De este conjunto de datos puede deducirse que el sistema serotoninérgico se encuentra más afectado por el envejecimiento en la corteza visual que en el núcleo geniculado, estructura esta última en la que no hemos encontrado cambios significativos.

De Lima y Singer (1987) observaron que en el geniculado, unos pequeños perfiles dendríticos que son la diana prioritaria de las sinapsis serotoninérgicas estaban innervados principalmente por proyecciones corticofugales. Por lo tanto, sugirieron que las sinapsis serotoninérgicas modulaban preferencialmente la eficacia de este sistema de retroalimentación. Tebecis y DiMaria, y Kemp y col., concluyen que la 5-HT actúa postsinápticamente en el geniculado, facili-

tando a neuronas que se identifican como interneuronas (Satinsky, 1967; Rinaldi y col., 1975). La función de estas interneuronas parece ser crítica para el procesamiento en el núcleo geniculado de la información procedente de la retina. Como se ha mencionado antes, la vía noradrenérgica coeruleogeniculada ejerce una fuerte influencia moduladora sobre la transmisión en el geniculado, influencia que en muchos casos es opuesta a la ejercida por la 5-HT. Se ha propuesto (Pasik y col., 1988) que en el geniculado, la 5-HT se libera ante todo de varicosidades no sinápticas, actuando sobre las membranas de las neuronas de proyección probablemente a través de receptores 5-HT<sub>1</sub>, resultando en una disminución de la excitabilidad de estas neuronas. Además, la 5-HT liberada sinápticamente excitaría las interneuronas vía receptores 5-HT<sub>2</sub>. Estas interneuronas inhiben a las neuronas de proyección a través de un mecanismo mediado por GABA, con lo cual el control ejercido por la 5-HT sobre la actividad de las neuronas de proyección del geniculado lateral es doble. Por el contrario, la NA tiene un efecto excitador sobre las células de proyección y un efecto inhibitorio sobre las interneuronas. Este efecto parece ser debido a una inhibición de las interneuronas, lo que conlleva una desinhibición de las neuronas de proyección (Satinski, 1967).

Nuestros resultados muestran que la razón entre las tasas de turnover de 5-HT y NA desciende en ambas estructuras cuando se comparan los animales viejos con los adultos, aunque los términos de esta razón varían de forma diferente en ambas estructuras. En el geniculado lateral, la disminución de la razón 5-HT/NA se debe a un aumento del turnover de NA, en tanto que en la corteza visual la disminución de la razón 5-HT/NA se debe al descenso en el turnover de 5-HT frente al mantenimiento del turnover de NA. De este modo, el decrecimiento de

esta razón podría conducir a una perturbación del equilibrio funcional entre los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico, con la consiguiente alteración en la función del geniculado lateral.

Parece probable que los grupos de células laterales del núcleo dorsal del rafe contengan una subpoblación neuronal que proyecta específica y conjuntamente al núcleo geniculado lateral y al colículo superior, y quizás también a otras áreas visuales, como por ejemplo la retina.

El significado funcional de las proyecciones serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe al geniculado lateral y al colículo superior está por clarificar. Otros factores deben considerarse. Por ejemplo, se ha mostrado que hay diferentes receptores para la 5-HT en el núcleo geniculado lateral y en el colículo superior, y que están heterogéneamente distribuidos (Marcinkiewicz y col., 1984; Pazos y Palacios, 1985; Pazos y col., 1985). Por lo tanto, la serotonina puede ejercer diferentes efectos en estas regiones. Sería también interesante establecer si las neuronas serotoninérgicas en las zonas laterales del núcleo dorsal del rafe contienen o no otros neurotransmisores. Otro asunto es el papel de las proyecciones no serotoninérgicas que se originan en el núcleo dorsal del rafe. De hecho, las proyecciones serotoninérgicas y las no serotoninérgicas pueden actuar de una forma integrada mediando los mecanismos de control en el geniculado lateral y en el colículo superior, y esta integración puede involucrar a las dos estructuras mediante las ramificaciones de las neuronas del núcleo dorsal del rafe que proyectan a estas dos estructuras.

La serotonina también ha sido estudiada en la corteza visual y en la retina. Así, en la rata se han descrito fibras 5-HT-immunoreactivas

en el neocortex (Lidov, 1980) y se ha informado que están presentes en todas las capas de la corteza visual (Parnavelas, col., 1987). Además, en la rata se han demostrado proyecciones desde el núcleo lateral del rafe hasta la corteza visual (Castaneyra-Perdomo, 1984).

#### 4.2.2.VIA EXTRAGENICULADA

##### 4.2.2.1. COLICULO SUPERIOR

Los niveles basales de 5-HT en esta estructura son menores en los animales viejos que en los adultos. Esta diferencia de concentración podría significar que ha habido una disminución del número de neuronas o una pérdida de la capacidad de almacenamiento de 5-HT por parte de las neuronas. La razón entre la concentración basal de 5-HT y la tasa de hidroxilación del triptófano *in vivo* es un buen indicativo de la capacidad de almacenamiento de 5-HT por parte de las neuronas serotoninérgicas (Hamon y Bourgoïn, 1982). El valor de esta razón es de 0,87 en los animales adultos y 0,60 en los viejos. Este dato parece indicar que existe una pérdida real de la capacidad de almacenamiento de 5-HT en el colículo superior de los viejos.

La tasa de síntesis de 5-HT, medida como acumulación de 5-HTP tras el bloqueo de la AADC con NSD-1015, no muestra cambios entre los animales adultos y los viejos. Este hecho se confirma con la medida de la acumulación de 5-HT tras el uso de pargilina, ya que los valores de turnover no muestran diferencias entre los animales adultos y los viejos. La degradación de 5-HT tampoco parece estar afectada por el envejecimiento, ya que la tasa fraccional de turnover medida tras el bloqueo de la MAO mediante pargilina es mayor en los animales viejos que en los adultos, y la tasa de turnover es similar en ambos grupos. Podemos utilizar la razón **tasa de desaparición de 5-HIAA/concentración**

basal de 5-HT como indicativo de una tasa fraccional general del sistema serotoninérgico (Nissbrandt y Carlsson, 1987). El cálculo de esta razón muestra unos valores de  $0,95 \text{ h}^{-1}$  para los animales adultos y  $1,31 \text{ h}^{-1}$  para los animales viejos. Estos valores son similares a los ya comentados de la tasa fraccional de turnover de 5-HIAA. Este aumento se debe a la disminución de la concentración basal de 5-HT y no a un aumento del turnover. La tasa de turnover del 5-HIAA medida tras la administración de probenecid es menor en los animales viejos que en los adultos. Esta discrepancia entre los valores del turnover de 5-HIAA calculados tras los tratamientos con pargilina y probenecid puede deberse a modificaciones en el proceso de conjugación inducidas por el probenecid. El probenecid puede alterar también la captación de triptófano por parte de las neuronas, lo que modificaría las tasas de síntesis y degradación de la 5-HT.

En general, podemos concluir que el sistema serotoninérgico no se ve afectado durante el envejecimiento en su capacidad funcional, aunque sí parece estar disminuida la capacidad de almacenamiento. Se ha observado que la 5-HT incrementa la glucogenolisis en el cerebro (Magistretti, 1988), que puede interactuar con factores de crecimiento nervioso (Patel y Lewis, 1988) y que actúa en el control de la actividad fisiológica del tectum (Segu y col., 1986).

En principio, no se debe esperar ninguna alteración de estas funciones dependientes de la 5-HT durante el envejecimiento, ya que si bien la concentración basal de 5-HT e incluso la capacidad de almacenamiento es menor en los viejos, estos no muestran ninguna disminución en el turnover de 5-HT, manteniéndose la capacidad de síntesis y utilización de la 5-HT por parte de las neuronas serotoninérgicas a

unos niveles similares a los del animal adulto. Por otra parte, la 5-HT puede estar ejerciendo funciones tróficas en el colículo superior de la rata. Estas funciones tampoco deben verse afectadas durante el envejecimiento, ya que el sistema serotoninérgico en el colículo superior muestra unos niveles de actividad similares en los animales adultos y los viejos.

El colículo superior recibe una clara inervación catecolaminérgica desde el tronco cerebral. La razón NA/DA tiene unos valores de 3,4 y 3,8 para los animales adultos y los viejos respectivamente, lo cual parece indicar que esta estructura es fundamentalmente noradrenérgica, actuando la DA simplemente como precursor de la NA. Esto está de acuerdo con las observaciones de otros autores, ya que el colículo superior es una estructura que no se asocia generalmente con la inervación dopaminérgica (Weller y col., 1987). Sin embargo, los tratamientos con pargilina y probenecid muestran que los valores del turnover de DA y NA no son paralelos, como se esperaría en el caso de que la DA actuara simplemente como precursor de la NA.

Los niveles de DA son bajos en el colículo superior comparados con los observados en otras estructuras no visuales (Santiago y col., 1987b; Venero y col., 1989), y no presentan diferencias entre los animales adultos y los viejos. Tras la administración de pargilina, la acumulación de DA se produce en dos intervalos tanto en los animales adultos como en los viejos. En el primer intervalo, se observa una acumulación rápida, mayor en los animales adultos que en los viejos; en el segundo, la acumulación es menor que en el primer intervalo, y en el caso de los viejos prácticamente inexistente. Estos resultados apoyan la existencia de dos compartimentos diferentes de DA en el colículo superior, tal y como se ha descrito previamente en estructu-

ras dopaminérgicas (Glowinski, 1975). En los animales viejos no se observa una acumulación significativa de DA a partir del minuto 10, lo que parece indicar que este segundo compartimento está modificado en los animales viejos, pudiendo llegar incluso a no ser funcional.

Los niveles basales de NA no muestran cambios entre los animales adultos y los viejos, aunque la tasa de acumulación de NA calculada tras la administración de pargilina es mucho menor en los animales viejos que en los adultos. Además, la razón MHPG/NA es menor en los animales viejos que en los adultos, lo que parece indicar una disminución en la utilización de la NA. El turnover de todos los metabolitos de la NA es menor en los animales viejos que en los adultos. Este conjunto de datos muestra que los sistemas catecolaminérgicos se encuentran afectados por el envejecimiento, observándose una clara disminución de su actividad. No obstante, el comportamiento de la DA y sus metabolitos no es paralelo al de la NA y sus metabolitos, lo que puede estar indicando que la DA, a parte de ser el precursor de la NA, puede tener por sí misma algún papel fisiológico en el colículo superior, como también hemos discutido previamente para la corteza visual.

Al igual que ocurre con otras estructuras (Hassler y Bak, 1969), el funcionamiento correcto del colículo superior puede depender entre otros factores de la interacción de los sistemas catecolaminérgicos y serotoninérgico. La interacción 5-HT-NA puede ser importante (como ya se discutió en el geniculado), ya que es bien conocida la modificación que in vivo ejerce la estimulación serotoninérgica sobre la actividad del locus coeruleus.

#### 4.2.2.2. TALAMO POSTERIOR

El tálamo juega un importante papel como estructura de relevo entre las aferencias sensoriales y la corteza cerebral (Jones, 1985). Esta estructura muestra una gran dependencia de las aferencias retinianas; cerca del 80% de las células ganglionares proyectan sobre el tálamo mediante colaterales que también alcanzan al colículo superior. Así mismo, hay conexiones corticotalámicas y talamocorticales que son muy importantes en el control del funcionamiento de ambas estructuras. Las monoaminas están implicadas en el control de las funciones talámicas y en las interconexiones corticotalámicas y talamocorticales.

El tálamo muestra comportamientos opuestos a los de la corteza visual cuando se comparan las concentraciones basales y las tasas de turnover de las diferentes sustancias estudiadas. Así, las concentraciones basales de serotonina no muestran cambios significativos cuando se comparan adultos y viejos. El cálculo de la razón **concentración basal de 5-HT/tasa de hidroxilación de triptófano**, utilizada como índice de la capacidad de almacenamiento de las neuronas serotoninérgicas (Hamon y Bourgoin, 1982), da unos valores de 1,93 h y 2,73 h para los animales adultos y los viejos respectivamente. La tasa de síntesis de 5-HT, calculada como acumulación de 5-HTP tras la administración de NSD-1015, es significativamente menor en los animales viejos que en los adultos. Sin embargo, la tasa de acumulación de 5-HT tras el tratamiento con pargilina es significativamente mayor en los animales viejos que en los adultos, al igual que la tasa fraccional y la tasa de turnover del 5-HIAA. La razón **tasa de desaparición de 5-HIAA/concentración basal de 5-HT** es indicativa de una tasa fraccional general del sistema serotoninérgico (Nissbrandt y Carlsson,





1987). Esta razón da unos valores de  $1,65 \text{ h}^{-1}$  para el animal adulto y  $2,35 \text{ h}^{-1}$  para el animal viejo respectivamente. Este conjunto de datos es contradictorio, ya que resulta difícil establecer una condición fisiológica que permita explicar que la tasa de síntesis de 5-HT en los animales viejos es menor que en los adultos al mismo tiempo que la concentración basal de 5-HT permanece sin cambios y las tasas de turnover de 5-HT y 5-HIAA (que tomadas en conjunto son un índice de la utilización y degradación de la 5-HT) aumentan en los animales viejos con respecto a los controles adultos. Una posible explicación a estos datos sería que el tratamiento con NSD-1015 tuviera efectos distintos en los animales adultos y en los viejos. Diferencias en el porcentaje de inhibición de la AADC o del tiempo que tarda en alcanzarse una inhibición total, conllevarían una medida alterada de la tasa de síntesis. De esta forma, podríamos estar subvalorando la tasa real de síntesis de la 5-HT en esta estructura, como ya se mencionó en la introducción de este estudio. Así, una tasa de síntesis de 5-HT igual o superiores en los animales viejos a las registradas en los animales adultos nos llevarían a la conclusión de que el sistema serotoninérgico no se ve afectado durante el envejecimiento es esta estructura, llegando incluso a mostrar una cierta aceleración, como ya se ha discutido para otras estructuras, y estando de acuerdo con observaciones previas que indican que el sistema serotoninérgico se ve poco alterado durante el envejecimiento. Es necesario recordar que algunas sustancias inhibitoras de la AADC (como el carbidopa) se utilizan como coadyuvantes en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En el caso de que existiera un verdadero efecto diferencial de estas sustancias inhibitoras de la AADC entre los individuos adultos y los vie-

jos, los tratamientos antiparkinsonianos podrían tener un resultado diferente al deseado. Se hace por tanto necesario un estudio profundo de la compleja farmacodinamia de estos compuestos en los individuos viejos antes de su uso en el tratamiento de seres humanos.

La DA no muestra cambios significativos entre los animales adultos y los viejos ni en la concentración basal ni en la tasa de acumulación tras el tratamiento con pargilina. Sin embargo, la concentración basal de DOPAC, así como su tasa fraccional y su tasa de turnover tras el tratamiento con pargilina descienden en los animales viejos. Sin embargo, el tálamo no es un área a la que se considere generalmente asociada a la inervación dopaminérgica, como lo demuestran las bajas concentraciones de DA y DOPAC encontrados, y los bajos índices de turnover calculados. Por tanto, esta bajada en la tasa de turnover de DOPAC en los animales viejos puede no ser representativa de un turnover alterado de DA, en tanto que esta sustancia, al contrario de lo discutido para otras estructuras, parece actuar en el tálamo como simple precursor en la síntesis de NA.

El tálamo posterior presenta una clara inervación noradrenérgica procedente del locus coeruleus. Esta estructura es la que presenta una mayor concentración basal de NA, así como las tasas de turnover más altas de las estructuras visuales estudiadas. La razón NA/DA alcanza unos valores de 13,5 en los animales adultos y de 13,1 en los animales viejos respectivamente. La NA muestra una bajada de su concentración y de su turnover en los animales viejos. La NMN muestra también descensos en su concentración basal y en su turnover durante el envejecimiento. El MHPG, principal metabolito de la NA, no muestra variaciones en su concentración basal, aunque tras el tratamiento con pargilina la tasa fraccional y la tasa de turnover disminuyen en los animales

viejos con respecto a los adultos. De este conjunto de datos puede deducirse que el sistema noradrenérgico se encuentra ralentizado en el tálamo posterior durante el envejecimiento.

Al discutir los resultados obtenidos en otras estructuras, hemos puesto de manifiesto la existencia de una clara interacción, previamente sugerida por otros autores entre los sistemas serotoninérgico y catecolaminérgico, interacción que generalmente es de tipo antagónico. Esto nos permite reforzar la hipótesis anteriormente propuesta de que la contradicción entre la tasa de síntesis de 5-HT y su tasa de turnover se debe a una alteración inducida por el envejecimiento del efecto del NSD-1015 sobre el tálamo.

#### **4.3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON NSD-1015 SOBRE LAS MONOAMINAS**

El NSD-1015 actúa inhibiendo a la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa. El efecto esperado tras el uso de este inhibidor es una acumulación del sustrato previo a la descarboxilación (L-DOPA y 5-HTP), y una bajada de los productos correspondientes (DA y 5-HTP). Sin embargo, estos resultados esperados discrepan de los que hemos obtenido. Si bien hemos observado la acumulación del sustrato previo, no hemos encontrado la esperada bajada de los productos posteriores a la descarboxilación, si no que hemos registrado acumulaciones. Hemos observado que las respuestas iguales se agrupan mejor por vías metabólicas que por estructuras. También existen diferencias entre las respuestas de los animales adultos y de los viejos.

La DA muestra comportamientos distintos según la edad y la estructura estudiada. Mientras que en los animales viejos no suele haber cambios de DA entre los animales tratados y los no tratados, en los

animales adultos encontramos fuertes bajadas, fuertes subidas y mantenimiento de la concentración de DA al comparar los animales tratados con los no tratados.

La NA muestra mantenimiento de la concentración tras el tratamiento en el colículo y en la corteza de los animales adultos y los viejos, y aumento en ambos grupos de edad en geniculado y tálamo.

La 5-HT muestra un comportamiento muy homogéneo, con aumento de su concentración tras el tratamiento con NSD-1015 en todas las estructuras y edades estudiadas, excepto en la corteza visual de los animales viejos, en los que no se registran cambios.

Así pues, podemos establecer una diferencia clara en el comportamiento de los sistemas catecolaminérgicos y serotoninérgico tras el tratamiento con NSD-1015. La 5-HT presenta un comportamiento más homogéneo, acumulándose en las estructuras visuales estudiadas de los animales adultos y viejos, en tanto que las catecolaminas muestran mantenimiento, acumulaciones y descensos. Estos datos parecen apoyar a los encontrados por otros autores, quienes sugieren la existencia de al menos dos formas enzimáticas que catalizan la descarboxilación de los aminoácidos aromáticos (Kuntzman y col., 1962; Sims y col., 1973; Rahman y Nagatsu, 1982). Además, se ha propuesto que la mayor parte de la actividad 5-HTP descarboxilasa es sinaptosomal, en tanto que la mayor parte de la actividad L-DOPA descarboxilasa está en forma soluble (Sims y col., 1973).

El NSD-1015 actúa como inhibidor específico de la AADC. Su acción debería ocasionar una disminución de las concentraciones de DA y 5-HT. En el caso de que hubiera errores en el tratamiento, o si la inhibición de la descarboxilasa no fuese total, se esperarían pequeñas bajadas en la concentración de DA y 5-HT, o un mantenimiento de las

mismas. Sin embargo, hemos observado acumulaciones de 5-HT, DA y NA en los animales tratados, y este hecho no puede explicarse exclusivamente con un comportamiento extraño de la AADC. La acumulación de 5-HT y DA requiere que la inhibición de la AADC sea menor que una posible inhibición de la MAO, o bien que la inhibición de esta sea más rápida que la inhibición de la AADC.

La disminución de las concentraciones de 5-HIAA y DOPAC no son determinantes para probar la hipótesis de la inhibición de la MAO por el NSD-1015 barajada por algunos autores (Nissbrandt y Carlsson, 1987), ya que una inhibición de la AADC sin ninguna otra interferencia mostraría el mismo efecto. Esta hipótesis de la inhibición se ve reforzada por la acumulación de NMN que encontramos tras el tratamiento con NSD-1015.

El comportamiento de la DA se acerca más a una actuación normal del NSD-1015 (es decir, inhibiendo exclusivamente a la AADC) que el observado en la 5-HT y la NA. Es necesario recordar que la 5-HT y la NA se consideran sustratos de la MAO A, mientras que la DA sería metabolizada por la MAO B o por ambas formas de MAO (Yang y Neff, 1974; Yu, 1986). Estos datos parecen sugerir que el efecto inhibitor del NSD-1015 sobre la actividad MAO es mayor sobre la MAO A que sobre la MAO B. La MAO A presenta una localización fundamentalmente neuronal (Jarrot e Iversen, 1971), en tanto que la MAO B es fundamentalmente glial (Yu, 1986). El supuesto efecto diferencial del NSD-1015 sobre las actividades MAO A y MAO B puede deberse a una diferencia en el acceso de este compuesto a la neurona y la glía.

## 5. CONCLUSIONES

1. Cada una de las estructuras estudiadas parece tener un patrón de envejecimiento propio con respecto al metabolismo de las monoaminas.
2. En general, los cambios relacionados con la edad de las concentraciones basales de las diferentes sustancias estudiadas no coinciden en su sentido con los cambios observados en las tasas de turnover.
3. En las estructuras estudiadas, los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico muestran comportamientos opuestos, especialmente en el geniculado lateral, estructura en la que estos sistemas ejercen efectos antagónicos.
4. En las estructuras estudiadas, el sistema serotoninérgico está menos afectado por el envejecimiento que los sistemas catecolaminérgicos, y dentro de estos, el sistema noradrenérgico lo está menos que el dopaminérgico.
5. Las estructuras de la vía geniculada muestran comportamientos diferentes, observándose más cambios en la corteza visual que en el geniculado durante el envejecimiento. El metabolismo de la NA parece disminuir en el geniculado y aumentar en la corteza visual. El sistema serotoninérgico se muestra más afectado en la corteza visual que en el geniculado lateral.

6. En el colículo superior, la DA parece estar distribuida en dos compartimentos diferentes, uno de utilización rápida y otro lento, estando éste último muy disminuido en los animales viejos.
7. El tálamo posterior muestra un comportamiento opuesto al de la corteza visual cuando se comparan los cambios de la concentración basal y el turnover de los diferentes metabolitos entre los animales adultos y los viejos.
8. La razón NA/DA sugiere que las estructuras visuales son fundamentalmente noradrenérgicas, aunque en el colículo superior y en la corteza visual la dopamina parece tener alguna función independiente de su papel como precursor de la noradrenalina, como lo indica el hecho de que en estas estructuras el turnover de la dopamina no es paralelo al de la noradrenalina.
9. El tratamiento con NSD-1015 produce una acumulación inesperada de 5-HT, NA, NMN y en menor grado de DA. La 5-HT se acumula en todas las estructuras estudiadas, pero el comportamiento de las catecolaminas no es homogéneo. El NSD-1015 puede estar inhibiendo a la monoamino oxidasa, aunque las actividades MAO A y MAO B pueden estar afectadas de forma diferente.
10. Las actividades TH, TPH y MAO B muestran un aumento general a lo largo del desarrollo, pero no así la actividad MAO A, que muestra un descenso generalizado durante el envejecimiento en las estructuras estudiadas.



## **6. BIBLIOGRAFIA**

- Algeri, S., Bonati, M., Brunello, N. and Ponsio, F. Dihydropteridine reductase and tyrosine hydroxylase activities in rat brain during development and senescence: a comparative study. *Brain Res.* **132**: 569-574, 1977.
- Altman, J. and Carpenter, M.B. Fiber projections of the superior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* **116**: 157-177, 1961.
- Amin, A.H., Crawford, T.B.B. and Gaddum, J.H. The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J. Physiol.* **126**: 596-618, 1954.
- Anthony, M. Plasma serotonin levels in migraine. *Advance Pharmacol.* **6B**: 203, 1968.
- Atkinson, J., Richtand, N., Schworer, C., Kuczenski, R. and Soderling, T. Phosphorylation of purified rat striatal tyrosine hydroxylase by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II: Effect of an activator protein. *J. Neurochem.* **49**: 1241-1249, 1987.
- Azmitia, E.C., Algeri, S. and Costa, E. In vivo conversion of  $^3H$ -L-tryptophan into  $^3H$ -serotonin in brain areas of adrenalectomized rats. *Science* **169**: 201-203, 1970.
- Bacq, Z.M. La pharmacologie du système nerveux autonome, et particulièrement du sympathique, d'après la théorie neurohumorale. Rapport au Congrès de l'Association des Physiologistes, Nancy. *Ann. Physiol.* **10**: 467-489, 1934.
- Bacq, Z.M. Arterenol as a possible sympathetic hormone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **62**: 37-38, 1938.
- Bacq, Z.M. and Fischer, P. Nature de la substance sympathicomimétique extraite des nerfs ou des tissus des mammifères. *Arch. Int. Physiol.* **55**: 73-91, 1947.
- Barger, G. and Ewins, A.J. Some phenolic derivatives of  $\beta$ -phenylethylamine. *J. Chem. Soc.* **97**: 2253-2261, 1910.
- Beck, C.H.M. Functional implications of changes in the senescent brain: a review. *Can. J. Neurol. Res.* **24**: 315-319, 1978.
- Beckstead, R. M. and Frankfurter, A. (1983) A direct projection from the retina to the intermediate gray layer of the superior colliculus demonstrated by anterograde transport of HRP in monkey, cat and rat. *Exp. Brain Res.* **52**: 261-268.
- Beevers, S. J., Knowles, R.G. and Pogson, C.I. (1983) A sensitive radiometric assay for tryptophan hydroxylase applicable to 1 crude extract. *J. Neurochem.* **40**: 894-897.
- Bender, A.D. The influence of age on the activity of catecholamines and related therapeutic agents. *J. Am. Geriatric Soc.* **18**: 20-232, 1970.

- Benetato, G., Uluitu, M., Suhaciu, G. and Iordache, S. Serotonin variations in hypothalamus and rhinencephalon in terms of age in rats. *Fiziologia normala si patologica* 13: 245-252, 1967.
- Bertler, A., Falck, B., Owman, C. and Rosengreen, E. The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 18: 369-385, 1966.
- Berman, N. Connections of the pretectum in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 174: 227-254, 1977.
- Bertler, A. and Rosengren, E. Occurrence and distribution of catecholamines in brain and other tissues. *Experientia*, 15: 10-11, 1959a.
- Bertler, A. and Rosengren, E. Occurrence and distribution of catecholamines in brain. *Acta Physiol. Scand.* 44: 273-292, 1958.
- Boadle-Biber, M.C. Biosynthesis of serotonin. In: Biology of serotonergic transmission. N.N. Osborne ed. John Wiley & sons. pp. 63-94, 1982.
- Bogdanski, D.F., Weissbach, H. and Udenfriend, S. The distribution of serotonin, 5-hydroxytryptophan decarboxylase and monoamine oxidase in brain. *J. Neurochem.* 1: 272-278, 1957.
- Boullin, D.J. and O'Brien, R.A. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine uptake and binding by blood platelets from children with Down's syndrome. *J. Physiol.* 212: 287-297, 1971.
- Brauer, K. and Schober, W. (1982) Identification of geniculotectal relay neurons in the rat's ventral lateral geniculate nucleus. *Exp. Brain Res.* 45: 84-88.
- Cannon, W.B. and Rosenblueth, A. Autonomic neuro-effector systems. McMillan, New York, 1937.
- Cano, J., Machado, A. and Reinoso-Suárez, F. Morphological changes in the retina of the ageing rats. *Arch. Gerontol. Geriatrics* 5: 41-50. (1986).
- Carlsson, A. and Waldeck, B. A fluorometric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta Physiol. Scand.* 44: 293-298, 1958.
- Carlsson A., Davis, J. N., Kehr, W., Lindqvist, M. and Atack, C. V. A. (1972) Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic aminoacid decarboxylase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275: 153-168.
- Carlsson, A. and Lindqvist, M. In vivo measurements of tryptophan and tyrosine hydroxylase activities in mouse brain. *J. Neural Transmission*, 34: 79-91, 1973.

- Carlsson, A. The in vivo estimation of rates of tryptophan and tyrosine hydroxylation: Effects of alteration in enzyme environment and neuronal activity. In: Aromatic amino acids in the Brain. Ciba Foundation Symposium 22, (Eds G.E.W. Wolstenholme and D.W. Fitzsimons), Elsevier, Amsterdam, pp. 117-125, 1974.
- Carlsson, A. and Winblad, B. Influence of age and time interval between death and autopsy on dopamine and 3-methoxytyramine levels in human basal ganglia. *J. Neural Transm.* **38**: 271-276, 1976.
- Carter, C.J. and Pycock, C.J. The effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic sites on spontaneous motor behaviour and amphetamine-induced stereotypy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **308**: 51-54, 1979.
- Castaneyra-Perdomo, A. Afferente verbindungen des visuellen kortex in der albinomaus. *J. Hirnforsch.* **25**: 405-416, 1984.
- Chase, T.N. and Murphy, D.L. Serotonin and central nervous system function. *Ann. Rev. Pharmacol.* **13**: 181-197, 1973.
- Collins, G.G.S., Sandler, M., Williams, E.D. and Goudim, M.G.H. Multiple forms of human brain mitochondrial monoamine oxidase. *Nature*, **25**: 817-820, 1970.
- Cotzias, G.C., Miller, S.T., Tang, L.C. and Papavasiliou, P.S. Levodopa, fertility and longevity. *Science* **196**: 549-551, 1977.
- Crommelinck, M., Roucoux, A. and Meulders, M. Eye movements evoked by stimulation of lateral posterior nucleus and pulvinar in the alert cat. *Brain Res.*, **124**: 361-366, 1977.
- Curzon, G., Theaker, P. and Phillips, B. Excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in migraine. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **29**: 85-90, 1966.
- Dahlstrom, A. and Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.* **62**, suppl. **232**: 1-55, 1964.
- Dean, P. and Redgrave, P. The superior coliculus and visual neglect in rat and hamster. I. Behavioural evidence. *Brain Res. Rev.* **8**: 129-141, 1984a.
- Dean, P. and Redgrave, P. The superior coliculus and visual neglect in rat and hamster. II. Possible mechanism. *Brain Res. Rev.* **8**: 143-153, 1984b.
- Dean, P. and Redgrave, P. The superior coliculus and visual neglect in rat and hamster. III. Functional implications. *Brain Res. Rev.* **8**: 155-163, 1984c.
- Dedek, J., Baumes, R., Tien-Duc, N., Gomeni, R. and Korf J. (1979) Turnover of free and conjugated (sulphonyloxy) dihydroxyphenylacet-

- ic acid and homovanillic acid in the rata striatum. *J. Neurochem.* 33: 687-695.
- DeLima, A.D. and W. Singer. The serotonergic fibers in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat: distribution and synaptic -connections demonstrated with immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* 258: 339-351, 1987.
- Di Chiara, G., Camba, G. and Spano, P.F. Evidence for inhibition by brain serotonin of mouse killing behaviour in rats. *Nature (Lond.)* 233: 272-273, 1971.
- Donnelly, J.F., Thompson, S.M. and Robertson, R.T. Organization of projections from the superior colliculus to the thalamic lateral posterior nucleus in the rat. *Brain Res.* 288: 315-319, 1983.
- Elks, M.L., Youngblood, W.W. and Kizer, J.S. Serotonin synthesis and release in brain slices: independence of tryptophan. *Brain Res.* 172: 471-486, 1979b.
- Ersparmer, V. 5-hydroxytryptamine and related indolealkylamines. Hand book of experimental Pharmacology. Vol. XIX, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1-928, 1966.
- Euler, U.S.v. A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (Sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiol. Scand.* 12: 73-97, 1946.
- Euler, U.S.v. Identification of the sympathomimetic ergone in adrenergic nerves of cattle (Sympathin N) with laevo-noradrenaline. *Acta Physiol. Scand.* 16: 63-74, 1948.
- Finch, C.E. Catecholamine metabolism in the brains of ageing male mice. *Brain Res.* 52: 261-276, 1973a.
- Finch, C.E. Monoamine metabolism in the ageing male mouse. In: Development and ageing in the nervous system. Ed M. Rockstein. Academic Press, New York, p. 199-213, 1973b
- Finch, C.E. Ageing and the regulation of hormones: a view in October 1974. In: Advances in experimental medicine and biology, vol 61, suppl. Explorations in ageing. Eds V.J. Cristafalo, J. Roberts and R.C. Adelman. p. 229-238, 1975.
- Fingl, E. and Gaddum, J.H. Hydroxytryptamina blockade by dyhydroergotamine in vitro. *Fed. Proc.* 12: 320-321, 1953.
- Freund, H. Ueber die pharmakologischen Wirkungen des desfibrinierten Blutes. *Arch. f. exp. Path. Pharmk.* 86: 596-642, 1920.
- Funk, C. Synthesis of dl-3:4-dihydroxyphenylalanine. *J. Chem. Soc.* 99: 554-557, 1911.
- Gaddum, J.H. Gefässerweiternde Stoffe der Gewebe, Thieme-Verlag, Leipzig, 1936.

- Gaddum, J.H. Antagonism between lysergic acid diethylamide and 5-hydroxytryptophan. *J. Physiol. (Lond.)*, 121: 15P, 1953.
- Gaddum, J.H. Drugs antagonistic to 5-hydroxytryptamine. In: Ciba Foundation Symposium on Hypertension, Humoral and Neurogenic Factors. (Eds. G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron), Little Brown, Boston, pp. 75-78, 1954.
- Gilbert, C.D. Microcircuitry of the visual cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 217-247, 1983.
- Glowinski, J. Properties and functions of intraneuronal monoamine compartments in central aminergic neurons. In: Handbook of Psychopharmacology, vol 3 (Iversen, L.L., Iversen, S.D. and Snyder, S.H., eds.) pp 139-167. Plenum Press, New York. (1975).
- Goldberg, M. E. and Wurtz, R.H. (1972) Activity of superior colliculus in behaving monkey. I. Visual receptive fields of single neurons. *J. Neurophysiol.* 35: 542-559.
- Goldstein, M., Bronaugh, R.L., Epstein, B. and Roberge, C. Stimulation of tyrosine hydroxylase activity by cyclic AMP in synaptosomes and in soluble striatal enzyme preparations. *Brain Res.* 109: 563-574, 1976.
- Goodman, D.C. and Horel, J.A. Sprouting of optic tract projections in the brain stem of the rat. *J. Comp. Neurol.* 127: 71-88, 1966.
- Gorea, E. and Adrien, J. Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 154: 285-291. (1988).
- Göthert, M. and Huth, H. Alpha-adrenoceptor-mediated modulation of 5-hydroxytryptamine release from rat brain cortex slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* 313: 21-26, 1980.
- Gottfries, C.G., Oreland, L., Wiberg, A. and Winbland, B. Brain levels of monoamine oxidase in depression. *Lancet* 2: 360-361, 1974.
- Guillery, R.W. Patterns of fiber degeneration in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat, following lesions in the visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 130: 197-213, 1967.
- Hamon, M., Bourgoïn, S., Hery, F, and Glowinski, J. Regulation of tryptophan hydroxylase. In: Structure and function of monoamine enzymes, vol. 10 (Usdin, E., Weiner, N. and Youdim, M.B.H. eds.), Marcel Deker, New York, 1977.
- Hamon, M., Bourgoïn, S., Artaud, F. and Nelson, D. Regulatory properties of neuronal tryptophan hydroxylase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 133: 231-251, 1981.
- Hassler, R. and Bak, I.J. Unbalanced ratios of striatal dopamine and serotonin after experimental interruption of strionigral connec-

- tions. In: Gillingham, F.J. and Donaldson, I.M.L. (eds.). Third Symposium on Parkinson's Disease, Churchill Livingstone, Edinburgh, London. pp 29-37. (1969).
- Hattori, T. and McGeer, P.L. Synaptogenesis in the corpus striatum of infant rat. *Exp. Neurol.* **38**: 70-79, 1973.
- Hofbauer, A. and Dräger, U. C. (1985) Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* **234**: 465-474.
- Holtz, P. Über die sympathicomimetische Wirksamkeit von Gehirnexttrakten. *Acta. Physiol. Scand.* **20**: 354-362, 1950.
- Hoyland, V.J., Shilliton, E.E. and Vogt, M. The effect of parachlorophenylalanine on the behaviour of cats. *Brit. J. Pharmacol.* **40**: 659-667, 1970.
- Huerta, M. F. and Harting, J. K. (1984) The mammalian superior colliculus : Studies of its morphology and connections. In H. Vanegas (ed): Comparative Neurology of the Optic Tectum. New York: Plenum, pp 687-773.
- Ichiyama, A. Nakamura, S., Nishizuka, Y. and Hayaishi, O. Tryptophan-5-hydroxylase in mammalian brain. *Advance Pharmacol.* **6A**: 5-17, 1968.
- Ichiyama, A. Nakamura, S., Nishizuka, Y. and Hayaishi, O. Enzyme studies on the biosynthesis of serotonin in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* **245**: 1699-1709, 1970.
- Itoh, K., Mizuno, N., Sugimoto, T., Nomura, S., Nakamura, Y. and Konishi, A. A cerebello-pulvinar-cortical and retino-pulvinar-cortical pathways in the cat as revealed by the use of the anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* **187**(2): 347-359, 1979.
- Jarrot, B. and Iversen, L.L. Noradrenaline metabolising enzymes in normal and sympathetically denervated vas deferens. *J. Neurochem.* **18**: 1-6, 1971.
- Jequier, E. Tryptophan hydroxylation in phenylketonuria. *Advance Pharmacol.* **6B**: 169-170, 1968.
- Johansson, B. and Rose, B.E. 5-Hydroxyindoleacetic and homovanillic acid levels in the cerebrospinal fluid of healthy volunteers with Parkinson's syndrome. *Life Science* **6**: 1449-1454, 1967.
- Jones, E.G. The thalamus. Plenum Press, New York. pp. 935. 1985.
- Joseph, J.A., Berger, R.E., Engel, B.T. and Roth, G.S. Age-related changes in the nigrostriatum: a behavioral and biochemical analysis. *J. Gerontol.* **33**: 643-649, 1978.
- Jouvet, M. Neurophysiology of the states of sleep. *Physiol. Rev.* **47**:

117-177, 1967.

- Jouvet, M. and Delorme, F. Locus coeruleus et Somneil paradoxal. *C. R. Soc. Biol.* 159: 895-899, 1965.
- Kadoya, S., Wolin, L. R. and Massopust, Jr., L. C. (1971) Photically evoked unit activity in the tectum opticum of the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 142: 495-508.
- Kassel, A. (1980) Superior colliculus projections to tactile areas of rat cerebellar hemispheres. *Brain Res.* 202: 291-305.
- Kaufman, S. Properties of the pterin-dependent aromatic amino acid hydroxylases, In: Aromatic Amino Acids in the Brain, Ciba Foundation Symposium 22, (Eds G.E.W. Wolstenholme and D.W. Fitzsimons), Elsevier, Amsterdam, pp. 85-108, 1974.
- Kaufman, S. Mixed function oxygenases-general considerations, In: Structure and Function of Monoamine Enzymes. (Eds. E. Usdin, N. Weiner and M.B.H. Youdim), Marcel DeKker, Inc., New York, pp 3-22, 1977a.
- Kaufman, S. and Fisher, D.B. Pterin requiring aromatic amino acid hydroxylases, In: Molecular Mechanisms of Oxygen Activation. (Ed. O. Hayaishi), Academic Press, pp. 285-369, 1974.
- Kawai, N. and Yamamoto, C. Effects of 5-hydroxytryptamine, LSD and related compounds on electrical activities evoked in vitro in thin sections from the superior colliculus. *Int. J. Neuropharmacol.* 8: 437-449, 1969.
- Kawamura, S., Sprague, J.M. and Niimi, K. Corticofugal projections from the visual cortices to the thalamus, pretectum and superior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 158: 339-362, 1974.
- Kemp, J.A., Roberts, H.C. and Sillito, A.M. Further studies on the action of 5-hydroxytryptamine in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *Brain Res.* 246: 334-337, 1982.
- Kent, S. Neurotransmitters may be weak link in the aging brain's communication network. *Geriatrics* 31, 105-111, 1976.
- Koch, C. The action of the cortical pathway on sensory thalamic nuclei: a hypothesis. *Neuroscience* 23(2): 39-406, 1987.
- Krieg, W.J.S. Connections of the cerebral cortex. I: The albino rat. A: Topography of the cortical area. B: Structure of the cortical area. *J. Comp. Neurol.* 84: 221-323, 1946.
- Krieger, H.P. and Krieger, D.T. Chemical stimulation of the brain: Effect on adrenal cortical release. *American J. Physiol.* 218: 1632-1641, 1970.
- Kuhn, D.M., Vogel, R.L. and Lovenberg, W. Calcium-dependent activation





of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**: 759-763, 1978.

- Kuhn, D.M., O'Callaghan, J.P., Juskevich, J. and Lovenberg, W. Activation of brain tryptophan hydroxylase by ATP-Mg<sup>++</sup>: Dependence on calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 4688-4691, 1980b.
- Langer, T.P. and Lund, R.D. The upper layers of the superior colliculus of the rat; A Golgi study. *J. Comp. Neurol.* **158**: 405-436, 1974.
- Levine, A. R., Pollard, H. B. and Kuhn, D.M. (1984) A rapid and simplified assay method for tyrosine hydroxylase. *Anal. Biochem.* **143**: 205-208.
- Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A. and Udenfriend, S. Elucidation of rate-limiting step of norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea pig heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **148**: 1-8, 1965.
- Lewandowsky, M. Ueber die Wirkung des Nebennierenextractes auf die glatten Muskeln, im Besonderen des Auges. *Arch. Physiol.* 360-366, 1899.
- Lewis, E.J., Harrington, C.A. and Chikaraishi, D.M. Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2550-3554, 1987.
- Lidov, H.G.W., Grzanna, R. and Molliver, M.E. The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat. An immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **5**: 207-227, 1980.
- Lieberman, A. R., Taylor, A.M. and Campbell, G. (1985) Axon terminals of the projection from the superior colliculus to the olivary pretectal nucleus in the rat. *Neurosci. Lett.* **56**:235-239.
- Linden, R. and V.H. Perry. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.* **272**: 145-149, 1983.
- Loewi, O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **189**: 239-242, 1921.
- Loewi, O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Naturwissenschaften*, **10**: 52-55, 1922.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lund, R. D. (1966) The occipitotectal pathway of the rat. *J. Anat. (London)* **100**: 51-62.
- Lund, J.S., Lund, R.D., Hendrickson, A.E., Burnt, A.H. and Fuchs, A.F. The origin of efferent pathways from the primary visual cortex Area 17 of the macaque monkey as shown by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* **164**: 287-304, 1975.

- Mackay, A.V.P., Davies, P., Dewar, A.J. and Yates, C.M. Regional distribution of enzymes associated with neurotransmission by monoamines, acetylcholine and GABA in the human brain. *J. Neurochem.* **30**: 827-839, 1978a.
- Magistretti, P.J. Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. *Diab. Met.* **14**, 237-246. (1988)
- Marcinkiewicz, M., Vergé, D., Gozlan, H., Pichat, L. and Hamon, M. Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT<sub>1</sub> sites in the rat brain. *Brain Res.* **291**: 159-163, 1984.
- Marshall, E.F., Stirling, G.S., Tait, A.C. and Todrick, A. The effect of iproniazid and imipramine on the blood platelet 5-hydroxytryptamine level in man. *Brit. J. Pharmacol.* **15**: 35-41, 1960.
- McGeer, E.G., Fibiger, H.C., McGeer, P.L. and Wickson, V. Ageing and brain enzymes. *Exper. Gerontol.* **6**: 391-396, 1971.
- McGeer, E.G. and McGeer, P.L. Neurotransmitter metabolism in the ageing brain. In: *Neurobiology of ageing*, vol. 3. R.D. Terry and S. Gershon eds. Raven Press, New York, pp. 389-404, 1976.
- McNamara, M.C., Miller, A.T.Jr., Benignus, V.A. and Davis, J.N. Age related changes in the effect of electroconvulsive shock (ECS) on the in vivo hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain. *Brain Res.* **131**, 313-320, 1977.
- McRae-Degueurce, A., Bérod, A., Keller, A., Chouvet, G., Jon, T.H. and Pujol, J.F. Alterations in tyrosine hydroxylase activity elicited by raphe nuclei lesions in the rat locus coeruleus: Evidence for the involvement of serotonin afferents. *Brain Res.* **235**: 285-301, 1982.
- Meek, J.L. and Lofstrandh, S. Tryptophan hydroxylase in discrete brain nuclei: Comparison of activity in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **78**: 377-380, 1976.
- Meek, J.L. and Neckers, L.M. Measurement of tryptophan hydroxylase in single brain nuclei by high pressure liquid chromatography. *Brain Res.* **91**: 336-340, 1975.
- Meltzer, H.Y. and Stahl, S.M. The dopamine hypothesis of schizophrenia: A review. *Schizophr. Bull.* **2**: 19-76, 1976.
- Montagu, K.A. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature*, **180**: 244-245, 1957.
- Montero, V. and Guilery, R. W. Degeneration in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat following interruption of the retinal or cortical connections. *J. Comp. Neurol.* **134**: 211-243, 1968.
- Nagatsu, T. Dopamine- $\beta$ -hydroxylase. In: *Neuromethods 5: Neurotrans-*

- mitters enzymes. (A.A. Boulton, G.B. Baker and P.H. Yu, eds.) Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 79-116, 1986.
- Nauta, W.J.H. and Bucher, V.M. Efferent connections of the striate cortex in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 100: 257-286, 1954
- Neckers, L.M., Biggio, G., Moja, E. and Meek, J.L. Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 201: 110-116, 1977.
- Neff, N. H. and Tozer, T. N. (1968) In vivo measurement of brain serotonin turnover. *Adv. Pharmacol.* 6A: 97-109.
- Neff, N. H., Tozer, T. N. and Brodie, B. B. (1967) Application of steady-state kinetics to studies of the transfer of 5-hydroxyindolacetic acid from brain to plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 158: 214-218.
- Nissbrandt H. and Carlsson, A. Turnover of dopamine metabolites in rat brain: Comparison between striatum and substantia nigra. *J. Neurochem.* 49: 959-967, 1987.
- O'Connor, J. M. Ueber den Adrenalingehalt de Blutes. *Arch. f. exp. Path. Pharmac.* 67: 195-232, 1912.
- Page, I.H. Serotonin (5-hydroxytryptamine). *Physiol. Rev.* 34: 563-588, 1954.
- Parnavelas, J.G., Papadopoulos, G.C. and Buijs, R.M. The noradrenaline, dopamine, dopamine and serotonin innervation of the rat visual cortex. *Proc. Soc. Neurosci.* 13: 360, 1987.
- Pasik, P., Pasik, T. and Holstein, G.R. Serotonin-immunoreactivity in the monkey lateral geniculate nucleus. *Exp. Brain Res.* 69: 662-666, 1988.
- Patel, A.J. and P.D. Lewis. Brain cell acquisition and neurotropic drugs with special reference to functional teratogenesis. *Prog. Brain Res.* 73: 389-402, 1988.
- Pazos, A. and Palacios, J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* 346: 205-230, 1985.
- Pazos, A., Cortés, R. and Palacios, J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res.* 346: 231-249, 1985.
- Phillipson, O.T., Kilpatrick, I.C. and Jones, M.W. Dopaminergic innervation of the primary visual cortex in the rat, and some correlations with human cortex. *Brain Res. Bull.* 18(5), 621-633, 1987.
- Pletscher, A., Shore, P.A. and Brodie, B.B. Serotonin release as a possible mechanism of reserpine action. *Science*, 122: 374-375, 1955.

- Poirier, L.J., Sourkes, T.L., Bonvier, G., Butcher, R. and Carabin, S. Striatal amines, experimental temor and the effect of harmaline in the monkey. *Brain*, 89: 37-52, 1966.
- Pujol, J.F., Keane, P., McRae, A., Lewis, B.D. and Renaud, B. Biochemical evidence for serotonergic control of the locus coeruleus. In: Garatini, S., Pujol, J.F., Samanin, R. (eds). Interactions between putative neurotransmitters in the brain. New York, Raven Press, pp. 401-410, 1978.
- Rapport, M.M. Serum vasoconstrictor (serotonin). V. Presence of creatine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.* 180: 961-969, 1949.
- Reader, T.A., de Champlain, J. and Jasper, H. Catecholamines released from cerebral cortex in the cat; decrease during sensory stimulation. *Brain Res.* 111:95-108, 1976.
- Reader, T.A. The effects of dopamine, noradrenaline and serotonin in the visual cortex of the cat. . *Experientia* 34: 1586-1587, 1978.
- Redgrave, P., Mitchell. I.J. and Dean P. Descending projections from the superior colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheatgerm-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.* 68: 147-167. (1987).
- Reis, D.J., Ros, R.A. and Joh, T.H. 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, 1977.
- Renaud, B., Buda, M., Lewis, B.D. and Pujol, J.F. Effects of 5,6-dihydroxytryptamine on tyrosine hydroxylase activity in central catecholaminergic neurons of the rat. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1739-1742, 1975.
- Ribak, C. E. and Peters, A. (1975) An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Res.* 92: 341-368.
- Rinaldi, P., Sutko, M., Mahnke, J.H. and Verzeano, M. Serotonin in the lateral geniculate. *Physiol. Behav.* 14: 95-102, 1975.
- Ritter, S. and Pelzer, N.L. Magnitude of stress-induced brain norepinephrine depletion varies with age. *Brain Res.* 152: 614-619, 1978.
- Robinson, D.S., Sourkes, T.L., Nies, A., Harris, L.S., Spector, S., Bartlett, D.L. and Kaye, I.S. Monoamine metabolism in human brain. *Arch. Gen. Psychiatry* 34: 89-92, 1977.
- Rogawski, M.A. and G.K. Aghajanian. Modulation of lateral geniculate neurone excitability by noradrenaline microiontophoresis or locus coeruleus stimulation. *Nature*, 287: 731-734, 1980a.

- Rogawski, M.A. and Aghajanian, G.K. Norepinephrine and serotonin: opposite effects on the activity of lateral geniculate neurons evoked by optic pathway stimulation. *Exp. Neurol.* 69: 678-694, 1980b.
- Saldade, M.C. and Orrego, F. Electrically induced release of  $^3\text{H}$ -dopamine from slices obtained from different rat brain cortex regions. Evidence for a widespread dopaminergic innervation of the neocortex. *Brain Res.* 130: 483-494, 1977.
- Samain, R., Gumulka, W. and Valzelli, L. Reduced effect of morphine in midbrain raphe lesioned rats. *Europ. J. Pharmacol.* 10: 339-343, 1970.
- Samorajski, T. Central neurotransmitters substances and aging: A review. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 25: 337-348. (1977).
- Samorajski, T. and Rolsten, C. Age and regional differences in the chemical composition of brains of mice, monkeys and humans. *Prog. Brain Res.* 40: 253-265, 1973.
- Santiago, M., Cano, J., Reinoso-Suárez, F. and Machado, A. Age-related changes of serotonin and its metabolites content in the visual system of the rat. *Mech. Age. Dev.* 38: 157-165, 1987a.
- Santiago, M., Cano, J., Machado, A. and Reinoso-Suárez, F. Postnatal development in the monoamine content in the striatum of the rat, *Biogenic Amines* 4 (4-6): 381-389, 1987b.
- Santiago, M., Machado, A. and Cano J. (1989) Age-related changes of catecholamines and their content in the visual system of the rat. *Mech. Age. Dev.* 47: 77-84.
- Satinsky, D. Pharmacological responsiveness of lateral geniculate nucleus neurons. *Int. J. Neuropharmacol.* 6: 387-397, 1967.
- Schneider, H.P. and McCann, S.M. Mono- and indolamines and control of LH secretion. *Endocrinology* 86: 1127-1133, 1970.
- Schober, W. (1971) Efferente and afferente Verbindungen des Nucleus Lateralis posterior thalamic ("Pulvinar") der Albinratte. *Z. Mikrok. Anat. Forsch. (Leipzig)* 95: 827-844.
- Seeman, P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of Schizophrenia. *Synapse*, 1: 133-152, 1987.
- Sefton, A. (1968) The innervation of the lateral geniculate and anterior colliculus in the rat. *Vision Res.* 8: 867-881.
- Sefton, A.J., Mackay-Sim, A. Baur, L.A. and Cottee, L.J. Cortical projections to visual centres in the rat: an HRP study. *Brain Res.* 215: 1-13, 1981.
- 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.
- Sheard, M.H. The effect of p-chlorophenylalanine on behaviour in rats: relation to brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res.* 15: 524-528, 1969.
- Shields, P.J. and Eccleston, D. Evidence for the synthesis and storage of 5-hydroxytryptamine in two separate pools in the brain. *J. Neurochem.* 20: 881-888, 1973.
- Simpkins, J.W., Mueller, G.P., Huang, H.H. and Meites, J. Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in ageing male rats: possible relation to gonadotropin secretion. *Endocrinology* 100, 1672-1678, 1977.
- Sims, K.L., Davis, G.A. and Bloom, F.E. Activities of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan decarboxylases in rat brain: Assay characteristics and distribution. *J. Neurochem.* 20: 449-464, 1973.
- Sourkes, T.L. Enzymology of aromatic amino acid decarboxylase. In: Structure and Function of Monoamine Enzymes. (Eds. E. Usdin, N. Weiner and M.B.H. Youdim), Macel Dejjer, New York, pp. 477-495, 1977.
- Stern, A.C., Johnson, A., Bronzino, J.D. and Morgane, P.J. Influence of electrical stimulation of the substantia nigra on spontaneous activity of raphe neurons in the anesthetized rat. *Brain Res. Bull.* 4: 561-565, 1979.
- Sugita, S., Otani, K., Tokunaga, A. and Terasawa, K. Laminar origin of the tecto-thalamic projections in the albino rat. *Neurosci. Lett.* 43: 143-147, 1983.
- Sugita, S., Otani, K., Tokunaga, A. and Terasawa, K. Distribution of the tecto-thalamic projection neurons in the hereditary microphthalmic rat. *Exp. Brain Res.* 60: 564-575, 1985.
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. Principles and procedures of statistics, 2nd ed., McGraw-Hill, New York.
- Straschill, M. and Perwein, J. Effects 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.* 324: 43-55, 1971.
- Swanson, L. W., Cowan, W. M. and Jones, E. G. (1974) An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the albino rat and the cat. *J. Comp. Neurol.* 156: 143-164.
- Takahashi, T. (1985) The organization of the lateral thalamus of the hooded rat. *J. Comp. Neurol.* 231: 281-309.

- Tappaz, M.L. and Pujol, J.F.M. Estimation of the rate of tryptophan hydroxylation in vivo: A sensitive microassay in discrete brain nuclei. *J. Neurochem.* **34**: 933-940, 1980.
- Taylor, A. M. and Lieberman, A. R. (1985) Tecto-fugal projections to the dorsal and ventral thalamus: EM-HRP studies. *Neurosci. Lett (Suppl.)* **2**: 514.
- Tebecis, A.K. and DiMaria, A. A re-evaluation of the mode of action of 5-hydroxy-tryptamine on lateral geniculate neurons: comparison with catecholamines and LSD. *Exp. Brain Res.* **14**: 480-493, 1972.
- Tenen, S.S. The effects of p-chlorophenylalanine, a serotonin depletor, on avoidance acquisition, pain sensitivity and related behaviour in the rat. *Psychopharmacologia.* **10**: 204-219, 1967.
- Thompson, S.M. and Robertson, R.T. Tectal and pretectal projections to the lateral thalamus of the rat. *Neurosci. Abstr.*, **6**: 839, 1980.
- Tipton, K. F. (1985) Determination of monoamine oxidase. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* **7**: 361-367.
- Torigoe, Y., Blanks, R. H. I. and Precht, W. (1986) Anatomical studies on the nucleus reticularis tegmenti pontis in the pigmented rat. II. Subcortical afferents demonstrated by the retrograde transport of HRP. *J. Comp. Neurol.* **243**: 88-105.
- Tozer, T. N., Neff, N. H. and Brodie, B. B. (1966) Application of the steady state kinetics to the synthesis rate and turnover time of serotonin in the brain of normal and reserpine treated rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **153**: 177-182.
- Twarog, B.M. Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J. Cell. Comp. Physiol.* **44**: 141-163, 1954.
- Twarog, B.M. and Page, I.H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* **175**: 157-161, 1953.
- Updyke, B.V. Topographic organisation of the projections from cortical areas 17, 18 and 19 onto the thalamus, pretectum and superior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* **173**: 81-122, 1977.
- Vaccari, A., Biassoni, R. and Timiras, P. S. (1983) Selective effects of neonatal hypothyroidism on monoamine oxidase activities in brain. *J. Neurochem.* **40**: 1019-1025.
- Venero, J.L. M. Santiago, A. Machado and J. Cano. Determination of monoamines and both forms of monoamine oxidase in the rat's Substantia nigra during postnatal development. *Life Sciences* **45**: 1277-1283, 1989.
- Vialli, M. Histology of the enterochromaffin cell system, in 5-hydroxytryptamine and related indolealkylamines. Handbook of

- experimental Pharmacology, Vol. XIX, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1-65, 1966.
- Vogt, M. The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J. Physiol.* 123: 451-481, 1954.
- Watanabe, K. and Kawana, E. (1979) Efferent projections of the parabrachial nucleus in rats: A HRP study. *Brain Res.* 168: 1-11.
- Weil-Malherbe, H. and Bone, A.D. Intracellular distribution of catecholamines in the brain. *Nature*, 180: 1050-1051, 1957.
- Weller, M. E., Rose, S., Jenner, P. and Marsden, C. D. (1987) In vitro characterization of dopamine receptors in the superior colliculus of the rat. *Neuropharmacol.* 26: 347-354.
- Welsh, J.H. The occurrence of an excitatory amine in the nervous system of Buccinum and its action on the heart. *Anat. Record.* 117: 637-638, 1953.
- Welsh, J.H. Serotonin as a possible neurohumoral agent. Evidence obtained in lower animals. *Annals of the N.Y. Acad. Sci.* 66: 618-630, 1957.
- Westerink, B.H.C. and DeVries, J.B. On the origin of dopamine and its metabolite in predominantly noradrenergic innervated brain areas. *Brain Res.* 330: 164-166, 1985.
- Wichmann, T. and Starke, K. (1988) Uptake, release and modulation of release of noradrenaline in rabbit superior colliculus. *Neurosci.* 26: 621-634.
- Wurtman, R.J. Discussion on tryptophan and tyrosine hydroxylation in vivo. In: Aromatic amino acids in the Brain. Ciba Foundation Symposium 22, (Eds G.E.W. Wolstenholme and D.W. Fitzsimons), Elsevier, Amsterdam, pp. 128, 1974.
- Yang, H.Y.T. and Neff, N.H.  $\beta$ -phenylethylamine: a specific substrate for type B monoamine oxidase of brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187: 365-371, 1973.
- Yang, H.Y.T. and Neff, N.H. The monoamine oxidase of the brain: selective inhibition with drugs and the consequences for the mechanism of the biogenic amines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 189: 733-740, 1974.
- Yu, P.H. Monoamine oxidase. In: Neuromethods 5: Neurotransmitters enzymes. (A.A. Boulton, G.B. Baker and P.H. Yu, eds.) Humana Press, Clifton, New Jersey, pp 235-272, 1986.



# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

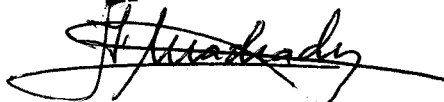
Reunido el Tribunal integrado por los señores doctores  
en el día de la fecha, para leer la Tesis Doctoral de

D. Antonio José Herrera Caruana  
titulada Influencias de la edad sobre el metabolismo  
de las monoaminas en las estructuras cerebrales de  
la riva visual de la rata

acordó otorgarle la calificación de APTO "CON LAUDE" por  
maestría

Sevilla, 26 de octubre 1990

El Vocal,



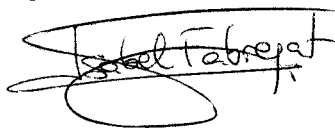
El Presidente

B. Gálvez

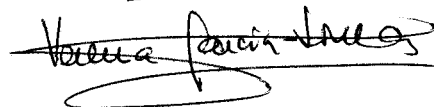
El Vocal,



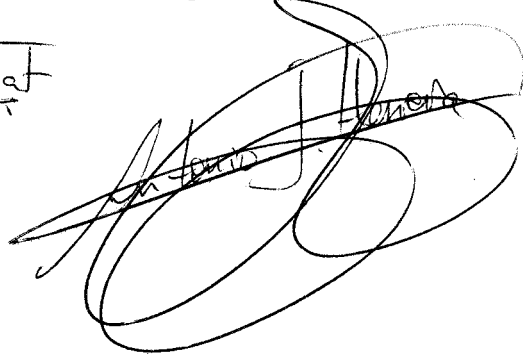
El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672495