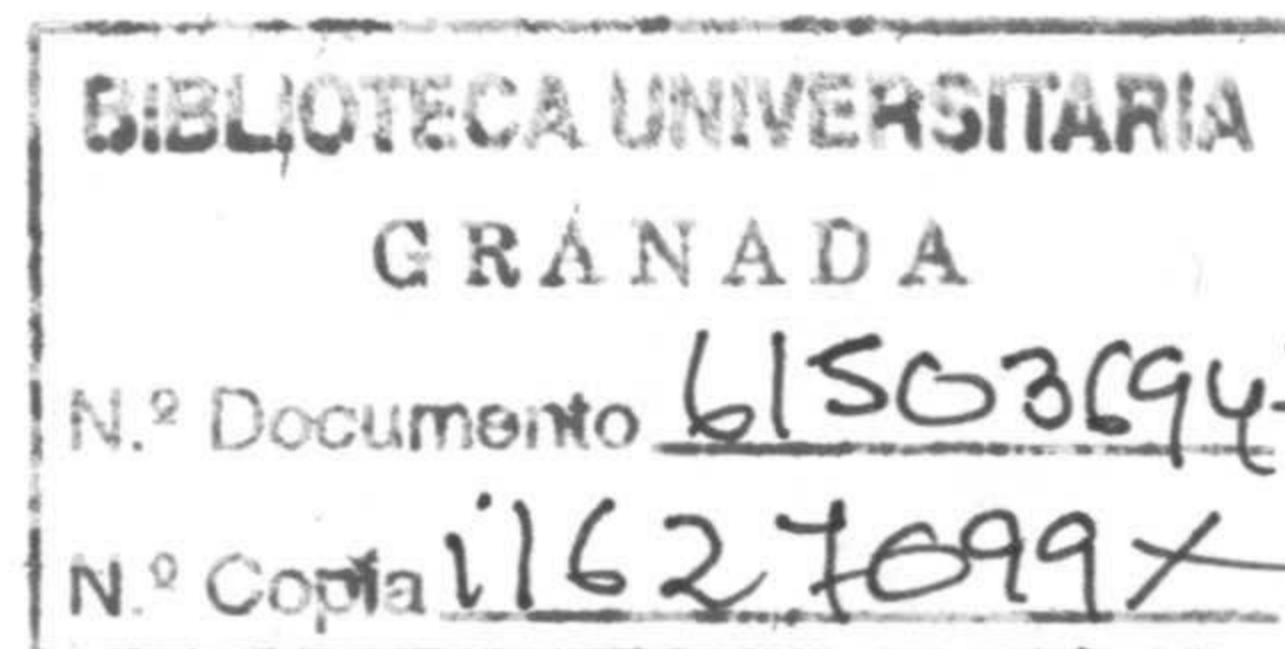


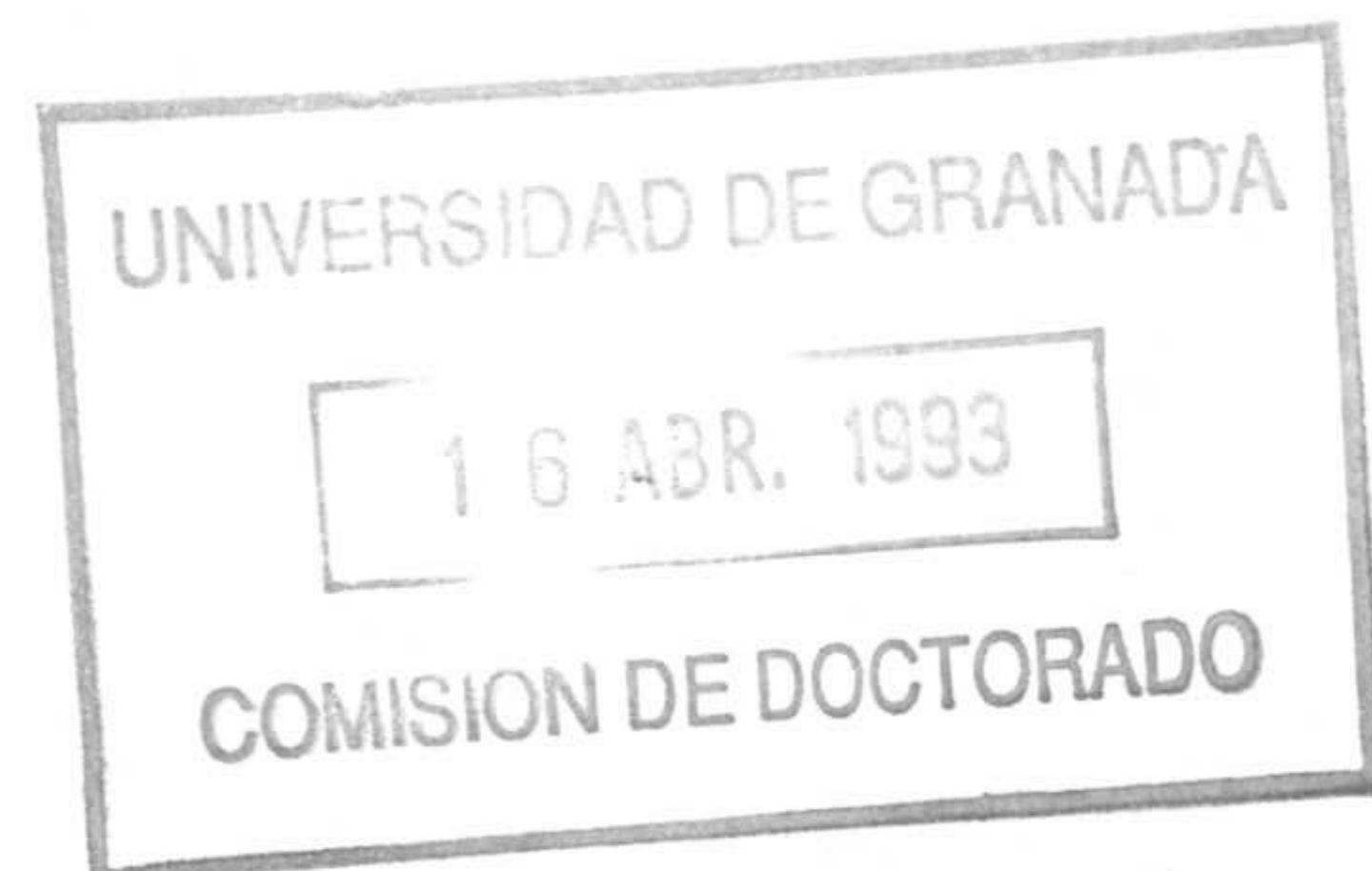


DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS "F. OLORIZ"

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**ENVEJECIMIENTO CEREBRAL: ANALISIS ESTEREOLOGICO  
SOBRE LA POBLACION NEURONAL Y NEUROGLIAL EN LA  
CORTEZA FRONTAL DE LA RATA. CORRELATOS  
NEUROQUIMICOS**



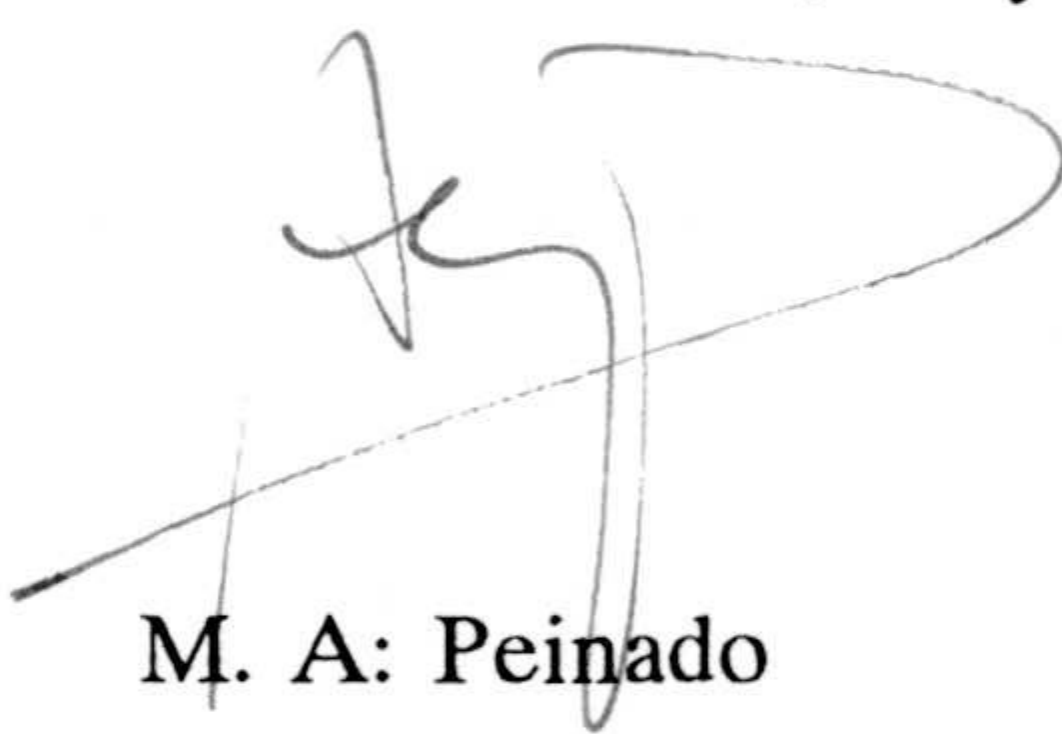
**MANUEL MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

Jaén, Abril 1993

WILLIAMSON  
J. H. WILLIAMSON  
J. H. WILLIAMSON  
J. H. WILLIAMSON

D<sup>ña</sup> M<sup>a</sup> Angeles Peinado Herreros, Profesora Titular de Biología Celular en la Facultad de Ciencias Experimentales del Campus Universitario de Jaén, y D. José M<sup>a</sup> Peinado Herreros Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, cetifican que la Tesis Doctoral titulada "Envejecimiento cerebral: Análisis estereológico sobre la población neuronal y neuroglial en la corteza frontal de la rata. Correlatos neuroquímicos", que presenta D. Manuel Martínez Martínez para optar al título de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo a juicio de ambos los requisitos exigidos para su presentación.

Granada, Mayo de 1991



M. A: Peinado



J. M. Peinado



A la hora de presentar ante el tribunal esta memoria quiero dejar patente mi agradecimiento a cuantas personas y entidades han hecho posible la realización de la misma.

A la Dra. D<sup>ña</sup> M<sup>a</sup> Angeles Peinado Herreros y al Dr. D. José M<sup>a</sup> Peinado Herreros, Directores de esta Tesis Doctoral, a quienes, por encima de las relaciones familiares que nos unen, tengo que reconocer su valía profesional ya que sus valiosos conocimientos científicos me han servido de guía provechosa en esta mi iniciación a la investigación. Su dedicación e indudable interés me han hecho superar siempre el día a día.

A la Dra. D<sup>ña</sup> Concepción Iribar Ibabe por su ayuda técnica e intelectual en la determinación de las actividades aminopeptidásicas, así como por su constante apoyo moral.

Al Prf. D. José Rodríguez Avi, del Departamento de Estadística, por su inestimable ayuda a la hora de efectuar los tratamientos estadísticos de nuestros datos experimentales. Apreciamos su excelente disposición en todo momento.

Al Dr. D. José Rodrigo García, Profesor de Investigación del C.S.I.C. (Instituto Cajal), que unió la ayuda material, proporcionándome los anticuerpos necesarios para las técnicas inmunohistoquímicas, con la intelectual, poniendo siempre a nuestra disposición sus conocimientos sobre el tema.

Al Dr. D. Antonio Ríos Guadix, Director del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada, que no solamente me permitió realizar mi trabajo, sino el poder utilizar los medios técnicos que he necesitado.

Al Dr. D. Juan Angel Pedrosa Raya, y al resto de los componentes de la Sección Departamental de Biología Celular del Campus de Jaén, por el estímulo, comprensión y colaboración que siempre he encontrado en ellos.

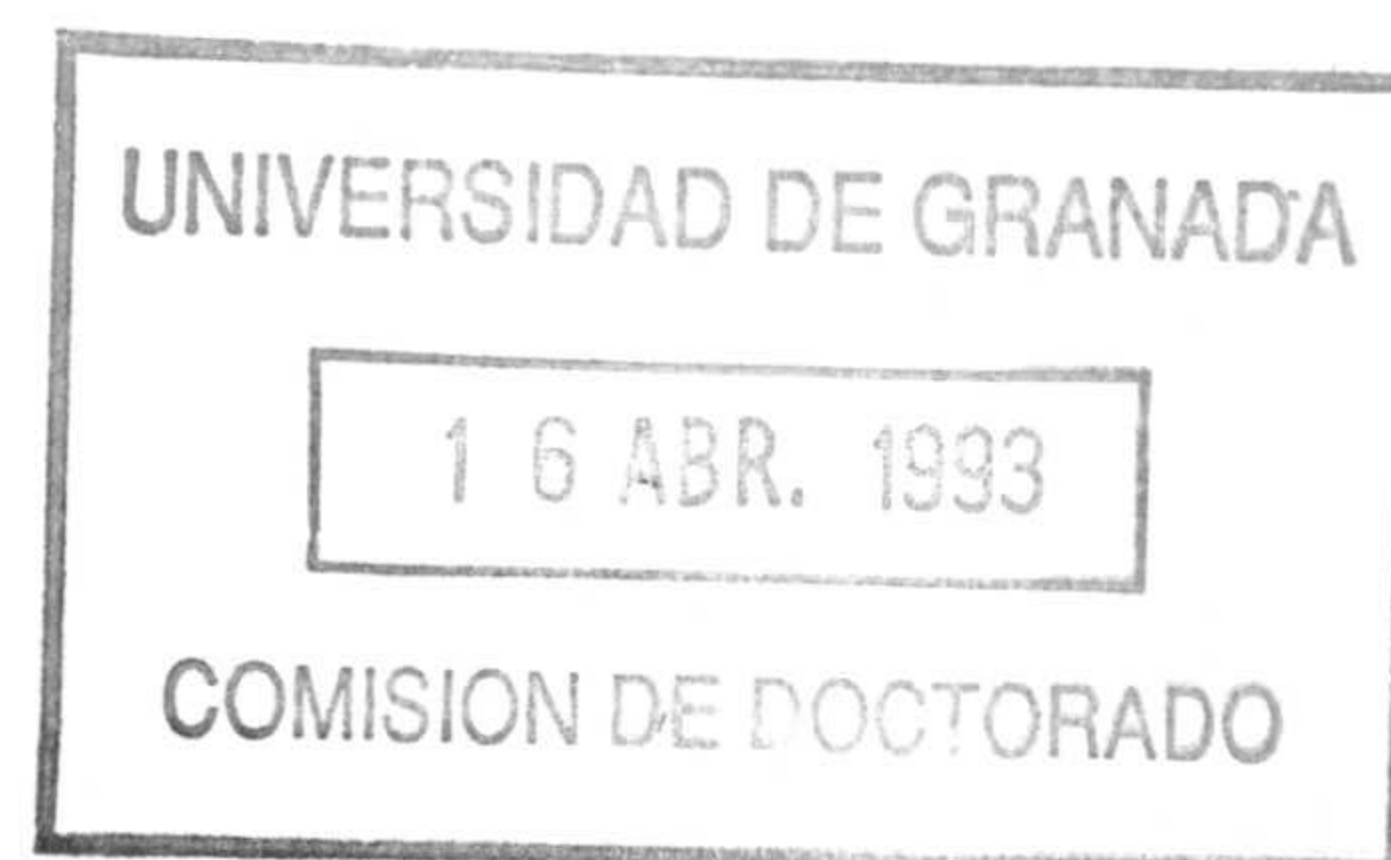
A Zeiss Ibérica S. A. que muy amable y desinteresadamente nos permitió utilizar unos equipos sin los cuales esta memoria quizás no hubiese sido lo que es o habría tardado más tiempo en poderse llevar a cabo.



La memoria que presentamos ha sido realizada en el Dpto. de *Biología Celular* de la Universidad de Granada en su Sección Departamental de Jaén en colaboración con el Dpto. de *Bioquímica y Biología Molecular* y el *Instituto Federico Oloriz* de la misma Universidad.

Para su realización hemos contado con la subvención de un *Proyecto de Investigación de la DGCIT PM 90-0146* y de *Ayudas a la Investigación de la Junta de Andalucía y del Campus de Jaén*.

Asímismo, el autor ha dispuesto de dos *licencias para estudios* concedidas por la Junta de Andalucía para Profesores de IB, por una duración total de 9 meses.



*A Manuel y Angela*



# INDICE

INTRODUCCION .....	1
1. <u>Neurohistología del envejecimiento cerebral</u> .....	1
1.1. Generalidades .....	1
1.2. Cambios macroscópicos .....	2
1.3. Cambios neuronales .....	3
1.3.1. Modificaciones estructurales de las neuronas .....	3
1.3.2. Modificaciones neuronales cuantitativas .....	4
1.4. Cambios gliales .....	8
1.3.1. Elementos constitutivos de la glia: pericitos, oligodendrocitos, microglia y astrocitos .....	8
1.3.2. Alteraciones durante en envejecimiento de la población glia	17
1.4. Neuropilo .....	19
2.- <u>Neuroquímica del envejecimiento cerebral</u> .....	21
2.1. Aminoácidos neurotransmisores y Sistema Nervioso .....	21
2.1.1. Aminoácidos dicarboxílicos .....	22
2.1.2. GABA .....	29
2.1.3. Taurina .....	31
2.2. Neurotoxicidad de aminoácidos excitadores .....	33
2.2.1. Mecanismo de neurotoxicidad de aminoácidos excitatorios .....	34
2.2.2. Neuropatología y aminoácidos excitadores .....	38
2.2.3. Receptores y neurotoxicidad .....	38
2.3.-Enzimas proteolíticos. Aminopeptidasas .....	39
2.3.1. Clasificación .....	39
2.3.2. Aminopeptidasas lisosomales y citosólicas .....	40
2.3.3. Aminopeptidasas cerebrales .....	42
2.3.4. Relación de las aminopeptidasas con la biotransformación de neuropéptidos .....	44
2.4. Cambios neuroquímicos durante el envejecimiento cerebral .....	45
2.4.1. Metabolismo energético .....	45
2.4.2. Homeostasis del Calcio (Ca <sup>++</sup> ) .....	46
2.4.3. Neurotransmisión .....	47
2.4.4. Alteraciones neuroquímicas en la enfermedad de Alzheimer .....	52
3. <u>La corteza frontal de la rata</u> .....	56
3.1. Funciones de la corteza frontal .....	56
3.2. Citoarquitectura de la corteza frontal de la rata .....	57
3.2.1. Corteza cingulada anterior .....	60
3.2.2. Región frontal .....	61
3.2.3. Región parietal .....	63



RESULTADOS .....	99
1. <u>Resultados morfométricos</u> .....	99
1.1. Volumen de la corteza frontal .....	100
1.2. Densidad neuronal en la corteza frontal .....	104
1.3. Densidad glial en la corteza frontal .....	110
1.4.-Superficies del soma y núcleo neuronal en corteza frontal .....	116
1.5.-Correlación entre diferentes parámetros morfométricos estudiados con cresil-violeta .....	125
1.6.-Densidad astrocitaria .....	130
2. <u>Resultados neuroquímicos</u> .....	136
2.1.-Análisis de aminoácidos en corteza fronta .....	137
2.2.-Análisis de la actividad aminopeptidásica en corteza frontal .....	141
DISCUSION .....	143
1. <u>Sobre el efecto de la edad en las poblaciones neuronal y glial</u> .....	144
1.1. Volumen cortical .....	144
1.2. Densidad neuronal .....	146
1.3. Areas del soma y núcleo neuronal .....	148
1.4. Densidad glial y astrocitaria .....	149
2. <u>Sobre el efecto de la edad en los niveles basales de aminoácidos</u> .....	152
2.1. Consideraciones previas .....	152
2.2. Aminoácidos excitadores .....	153
2.3. Otros aminoácidos .....	154
3 <u>Sobre el efecto de la edad en la actividad aminopeptidásica</u> .....	157
CONCLUSIONES .....	161
BIBLIOGRAFÍA .....	163

# **INTRODUCCION**

## **1.-NEUROHISTOLOGIA DEL ENVEJECIMIENTO CEREBRAL**

### **1.1.-GENERALIDADES**

Desde una perspectiva histórica, los primeros estudios sobre sistema nervioso y envejecimiento se refieren fundamentalmente a aspectos morfológicos. Ya a principios de siglo, algunos patólogos observaron que la apariencia de secciones de cerebro variaba entre jóvenes y viejos particularmente por la presencia de acumulos de pigmentos en estos últimos (Stubel'11). No obstante, no fue hasta la década de los 50 cuando comenzaron a proliferar estudios sistematizados, no solo sobre aspectos morfológicos del envejecimiento sino también sobre aspectos fisiológicos. Del conjunto de estos estudios se dedujo que eran las áreas de asociación de la corteza cerebral, de mas reciente adquisición en la evolución, las más afectadas por el proceso (Jones'83; Kemper'84). En este plano se encuentran los estudios sobre sistemas de neurotransmisores (Rogers y Bloom'85; Wenk y col'89; Palmer y Bowen'90; Palmer y Gershon'90) o incluso los estudios de carácter genético (Selkoe'91). No

obstante, cualquier análisis del tema requiere el correlato histológico que permita completar e interpretar correctamente los datos obtenidos. Este aspecto, ha cobrado recientemente una mayor relevancia con el desarrollo de las modernas técnicas de inmunocitoquímica, que permiten asociar la localización de casi cualquier trazador bioquímico, con su soporte morfológico e identificarlo en el tejido in situ. Otra aportación de sumo interés en este campo y que viene a complementar las anteriores, procede de la aplicación de las técnicas estereológicas y cuantitativas a los estudios citológicos e histológicos del envejecimiento. Estudios de este tipo están permitiendo evaluar e identificar diferentes poblaciones neuronales y neurogliales en múltiples áreas del cerebro. El estudio del comportamiento de tales poblaciones, su cuantificación, citomorfometría y análisis ultraestructural debe conducir a un conocimiento más completo de la etiología del proceso. Así pues, el enfoque del tema desde diferentes puntos de vista y en particular desde la perspectiva de la histología cuantitativa y la bioquímica conducirá, no cabe duda, a una mejor comprensión del mismo.

### 1.2.-CAMBIOS MACROSCÓPICOS

Existen diversos cambios macroscópicos asociados a envejecimiento del cerebro humano, tales como descenso de peso y volumen (Cotman y Peterson'89; Richardson'82), ensanchamiento de ventrículos (Cotman y Peterson'89; De Leon y col.'84), estrechamiento de giros y surcos (Cotman y Peterson'89; Domino y col.'82) y aumento en el volumen del líquido cefalorraquídeo (Domino y col.'82). Concretamente en humanos se ha estimado que hacia los 70 años de edad, el cerebro es un 6% menos voluminoso que en los jóvenes. Dicha disminución varía en función de la zona, siendo de un 17% en el lóbulo frontal, de un 20% en el ganglio basal y nula en la zona parieto-occipital. Incluso algunas zonas como el lóbulo temporal, el giro pre y postcentral y la amígdala, sufren un aumento de volumen (ver revisión de Haug y col.'84). Sin embargo, el cerebro de la rata sufre un pequeño aumento de peso a lo largo de su vida (Jones'83), habiendo sido descrito, además, que el grosor de la corteza cerebral de estos animales disminuye desde el nacimiento a la madurez, aunque permanece estable durante el envejecimiento (Diamond y col.'75).

Todos estos cambios macroscópicos son la consecuencia de otra serie de cambios que se detectan a nivel submicroscópico y que afectan a todo el complejo entramado de células, fibras y vasos que constituyen el tejido nervioso de la zona afectada.

### 1.3.-CAMBIOS NEURONALES

#### *1.3.1.-Modificaciones estructurales de las neuronas*

Cuando una célula nerviosa envejece comienza por presentar anomalías en su citoesqueleto a nivel tanto de pericarion como de las prolongaciones. Se segregan en exceso una serie de proteínas filamentosas insolubles, algunas de las cuales pueden adoptar una conformación en doble hélice. Dichas proteínas se acumulan en el citoplasma para formar las llamadas marañas neurofibrilares (Katzman y col'89).

Estas estructuras filamentosas, pueden llegar a acotar el espacio de citoplasma disponible, e interferir con el desarrollo de las funciones metabólicas propias de la neurona (Goldman y Yen'86; Pollock y Wood'88). Aunque, las marañas neurofibrilares se encuentran normalmente en el cerebro envejecido, aumentan fundamentalmente durante la novena decena de la vida y están comúnmente asociadas al diagnóstico patológico de la enfermedad de Alzheimer. Estas lesiones son particularmente abundantes en las neuronas de las cortezas frontal y temporal y del hipocampo. Su presencia parece ser exclusiva del SNC humano (Jones'83).

Otro efecto del envejecimiento de las neuronas corresponde a la hipertrofia (Vaughan y Vincent'79) y desorganización (Hinds y Mc Nelly'78) de orgánulos tales como el retículo endoplasmático implicado en los procesos de secreción y biosíntesis celular. También se han descrito alteraciones estructurales del retículo endoplasmático liso relacionadas con la edad que podrían afectar al proceso de renovación de las membranas axónicas y vesículas sinápticas, realizado mediante transporte axónico rápido (Jones'83).

Otra consecuencia del envejecimiento de las neuronas es el deterioro y reducción de las mitocondrias (Johnson'85; Rogers y Styren '87; Miquel y col'83) que tiene lugar de forma paralela al aumento de la porción lisosómica (Miquel'81). Como consecuencia de los procesos de digestión celular de los lisosomas, se acaban acumulando cuerpos residuales, particularmente abundantes en neuronas muy viejas donde son característicos y se conocen como gránulos de lipofuchina (Bjorkerud'64). Los gránulos de lipofuchina se han aislado de forma semipura en varios laboratorios (Brizzee y col'75). Se trata de productos insolubles, resultado de la autooxidación de lipoproteínas procedentes fundamentalmente de membranas intracelulares. Muestran un característico color marrón oscuro, siendo fluorescentes cuando se les excita con luz ultravioleta. El papel de la lipofuchina, en cuanto a su implicación en el resto de procesos neurodegenerativos provocados por el envejecimiento, no ha sido todavía establecido. Se ha sugerido, que al ocupar en algunos casos, el 80% del volumen del pericarion, debe perjudicar la normal función celular (Strehler '83). Tal vez el dato más



llamativo al respecto, haya sido el hallazgo de una correlación negativa, entre contenido en lipofuchina y contenido de material de Nills (acumulos ribosómicos) (Mann y Yates'64). No obstante, no se ha encontrado una correlación lineal entre acumulos de este pigmento y enfermedades como las demencias (Cotman y Peterson '89).

La degeneración granulovascular, otra consecuencia del proceso de envejecimiento de las neuronas, aparece sobre todo asociada a enfermedades degenerativas del SNC (Alzheimer, Pick, encefalitis crónica..), pero también puede asociarse en ocasiones al proceso de envejecimiento normal (Brizze'75). Son acumulos de gránulos argirófilos de 0,5 a 1,5  $\mu$  de diámetro rodeados de vacuolas de hasta 5 $\mu$ . Se sitúan en el soma de la neurona y pueden desplazar el núcleo a la periferia. Su presencia parece estar asociada a un descenso en la concentración de lipofuchina. Los estudios con microscopio electrónico han permitido interpretar estas estructuras como vacuolas autofágicas que indican la puesta en marcha de procesos de autodestrucción celular (Wisniewky y Terry'76). Se encuentran generalmente asociadas a marañas neurofibrilares y placas seniles. Se han descrito en diferentes localizaciones de la corteza cerebral y en el hipocampo (Brizze'75).

Las neuronas implicadas en estos procesos de neurodegeneración, muestran paralelamente reducción del tamaño del soma (Terry y col.'87). Además el núcleo de la célula parece irse inactivando progresivamente desde el punto de vista metabólico. En este sentido, llaman la atención una serie de estudios realizados por Strehler (1983), que miden la cantidad de DNA responsable de la síntesis de RNAr (Genes del organizador nucleolar) en individuos de diferentes edades y en distintos órganos. Los resultados encontrados en cerebro indican, que existe una progresiva pérdida de genes del organizador nucleolar de forma edad dependiente.

### *1.3.2.-Modificaciones neuronales cuantitativas*

El proceso neurodegenerativo que acompaña al envejecimiento cerebral, puede comportar también variaciones de las poblaciones neuronal y neuroglial. Así diferentes estudios han descrito en humanos la existencia de pérdida neuronal seguida de fenómenos de gliosis reactiva. No obstante, existe una gran heterogeneidad en este proceso, ya que mientras ciertas regiones cerebrales sufren pérdidas neuronales importantes, en otras las pérdidas son menores o incluso inexistentes (Beal y col'86a). Así por ejemplo, ciertas zonas cerebrales presentan descensos absolutos del número de neuronas en relación a la edad, como ocurre con las células de Purkinje de la corteza cerebelosa (Jones'83). En hipocampo (Jones'83), sustancia negra (Anderson y col'83), locus coeruleus y núcleo basal de Meynert (Mc Geer'84) también se ha encontrado descenso de neuronas asociado al envejecimiento. En contraste a lo descrito para sustancia negra y locus coeruleus, no parece haber pérdida de población neuronal en otras áreas del tronco del encefalo. En particular el recuento de neuronas no varia con la edad en

los núcleos facial, central cloclear, abducens, troclear u olivar inferior ni tampoco en los núcleos del cerebelo (Jones'83).

En otras especies como los roedores, la perdida relativa encontrada en zonas equivalentes del cerebro parece ser bastante menor que en humanos. Tal es el caso de determinados núcleos hipotalámicos (Hsu y Peng'78), bulbo olfatorio (Hinds y Mc.Nelly'77), área C1 del hipocampo y girus dentatus (Isimaru '91). En ratón, tampoco en los núcleos subtalámico y entopeduncular se ha encontrado descenso de células nerviosa con la edad (Sturrock'91). De hecho, estudios llevados a cabo en sustancia negra detectan pérdidas en humanos del 60% de la población neuronal, mientras que en rata estas perdidas no llegan a alcanzar el 20% (Morgan y col'87). En el hipocampo, la pérdida no excede tampoco el 20% aunque la densidad sináptica se mantiene (Jones'83).

En corteza cerebral, los datos existentes también son controvertidos. De hecho, aunque diferentes investigaciones sobre el tema parecen indicar, tanto en humanos (Haug'84) como en roedores (Curcio y Coleman'82), que no existen variaciones ni en la densidad neuronal ni en el número total de neuronas con el envejecimiento, otras por el contrario parecen estar a favor de la pérdida (Brody'55; 80; Henderson '80; Devaney y Jhonson'80) o al menos de la existencia de ciertas alteraciones que afectan además a la población neuroglial (Terry y col'87; Jones'83).

En recuentos realizados humanos (Brody'55) en todo el grosor de la corteza de individuos neonatos pasando por diferentes edades y hasta los 95 años, se ha descrito una progresiva y significativa pérdida neuronal en función de la edad (Brody'55 ). Dicha pérdida se localiza fundamentalmente en el giro precentral, en la corteza superior temporal y en la corteza visual, no detectandose pérdidas en la zona del giro postcentral. Posteriormente en un estudio comparable en la zona del giro frontal superior (Brody'80), se obtienen pérdidas neuronales de hasta un 48% entre la 5ª y la 9ª década de la vida. Henderson y col. (1980), utilizando un sistema de análisis de imagen computarizado, realizan un trabajo en el que encuentra pérdidas neuronales significativas con el envejecimiento en el giro precentral, postcentral, superior e inferior temporales y en el giro recto, después de examinar cerebros de sujetos comprendidos entre los 16 y los 95 años de edad. Devaney y Johnson (1980), realizan recuentos neuronales en el área de proyección de la mácula de la corteza visual en sujetos desde 20 hasta 87 años, encontrando pérdidas que superan el 50% de las neuronas de la zona. En resumen, todos estos estudios realizados en diferentes áreas la corteza cerebral humana, parecen indicar pérdida neuronal con envejecimiento normal.

A diferencia de lo expuesto, existen otra serie de trabajos que sugieren lo contrario; es decir, que no tienen lugar pérdidas neuronales relacionadas con la edad en la corteza cerebral humana (Cragg'75; Anderson y col'83; Haug'84; Terry y col'87). Una posible explicación a estas discrepancias podría basarse en diversos aspectos metodológicos como por ejemplo la retracción que sufre el tejido cuando se utilizan cortes incluidos en parafina a la

hora de comparar densidades neuronales en corteza cerebral de sujetos de diferentes edades (Cragg'75; Haug'84).

Anderson y col (1983) y Terry y col (1987) en investigaciones llevadas a cabo en diferentes zonas de la corteza cerebral de humanos, detectan una ligera pérdida con la edad en la población neuronal de diámetro superior a  $90\mu$ . No obstante, sugieren que dicha pérdida no sería tal sino la consecuencia de una disminución en el tamaño de estas neuronas, ya que paralelamente encuentran un incremento de la población de células pequeñas ( $40-90\mu$ ). Además, los datos procedentes de humanos tienen el inconveniente del estado de preservación en que se encuentra el cerebro, ya que en la mayoría de los casos transcurren largos períodos de tiempo hasta que las muestras pueden ser sometidas al proceso de fijación.

Los estudios realizados en animales de experimentación no presentan los problemas anteriormente expuestos, ya que permiten una buena preservación del tejido al poder someter el cerebro a métodos de perfusión-fijación. Tal es el caso de los estudios realizados por Brizzee (1973), Brizzee y col (1975) y Brizzee (1980) que examinan la corteza sensorimotora de monos jóvenes (4-6 años) y viejos (18-20 años). Dichos autores, no detectan cambios en el grosor de la corteza, aunque si encuentran un decrecimiento de la densidad neuronal que interpretan como pérdida neuronal.

Vincent y col. (1989), en un estudio realizado en corteza visual de mono, determinan que el grosor de la corteza no se modifica con la edad ni tampoco el número de neuronas en la zona. Sin embargo, los mismos autores hacen alusión a la alta desviación que presenta este último parámetro entre diferentes individuos, incluso del mismo grupo de edad, por lo que indican que solo en el caso de haberse encontrado pérdidas neuronales superiores a un 20-30% estas hubieran podido ser detectadas. Asimismo, estudios llevados a cabo por Tigges y col (1988) en el área 4 de la corteza motora de estos mismos animales, conducen a similares resultados, es decir no llegan a detectarse pérdidas neuronales.

En roedores viejos, los estudios estereológicos y cuantitativos conducen en general a la conclusión, de una cierta estabilidad en el volumen de la estructura cerebral así como en la población neuronal con la senectud. En este sentido, Vaughan y Cahill (1984), en estudios realizados en la corteza auditiva de rata, encuentran que no existen cambios con la edad, ni en el grosor total de la corteza ni en el de cada una de las capas individualmente. Con respecto a los estudios de cuantificación, algunos autores encuentran estabilidad en la densidad neuronal en ciertas áreas (Brizzee y col'68) aunque sin embargo en otras decrece (Ordy y col'78; Brizzee y Ordy'79). Otro ejemplo, de la controversia existente sobre el tema, lo aporta un estudio llevado a cabo por Hind y McNelly (1981). Los autores realizan cuantificaciones de la misma estructura en dos razas distintas de ratones encontrando pérdidas neuronales en una de ellas pero no en la otra.

Tal vez, el estudio más completo sobre este tema, corresponde al llevado a cabo por Curcio y Coleman (1982), que analiza el número total de neuronas existentes en estructuras que, como los barriles de la corteza somatosensorial, permiten evaluar con exactitud su volumen total. Esta forma de proceder, evita los errores que pudiera introducir la retracción del tejido permitiendo estimar toda la población neuronal de la estructura y no solo densidades neuronales en zonas puntuales. Estos estudios llegan a la conclusión, de que existe estabilidad en el número de neuronas, pero sin embargo dejan muy claro, que sus datos no son extrapolables a otras zonas o especies, y animan al estudio de los mecanismos que provocan estas diferencias regionales e interespecíficas.

Otro aspecto interesante que merece la pena destacar en el proceso de envejecimiento cerebral en corteza, se refiere a los datos obtenidos de las observaciones citoarquitectónicas y ultraestructurales. De hecho, estudios recientes sobre el tema llegan a resultados que fundamentan la idea de pocos signos de pérdida neuronal masiva, ya que con la excepción de cierta cantidad de acumulos de lipofuchina, como se ha mencionado con anterioridad el aspecto de la neuronas en sujetos viejos parece relativamente normal (Vincent y col'89). No obstante, se ha podido observar disminución para el tamaño del soma neuronal tanto en humanos (Terry y col.'87) como en roedores (Brizzee y col.'75). De hecho, estos últimos autores, observan en la corteza somatosensorial de rata disminución del tamaño neuronal entre los 13 y 23 meses de edad. No obstante, los estudios realizados sobre el tema todavía son muy escasos habiendo sido analizadas solo zonas puntuales.

Vincent y col. (1989), en un estudio llevado a cabo en el área 17 de la corteza visual de mono, combina estudios ultraestructurales y técnicas de cuantificación. Dichos autores, a tenor de los resultados obtenidos, proponen la existencia en la zona, de cierta degeneración neuronal que afecta fundamentalmente a dendritas y axones mielínicos. Sin embargo, sus análisis, que también incluyen cuantificación de perfiles neuronales en bandas de corteza de tamaño conocido, coinciden en la no detección de grandes signos de deterioro en el pericarion, excepto por la presencia de lipofuchina. Por consiguiente, concluyen que el proceso de neurodegeneración no llega a provocar pérdidas neuronales significativas con la edad. En cualquier caso en este estudio, queda sin explicar la presencia en el neuropilo circundante de individuos viejos, de grandes vacuolas rodeadas de membrana. Esta serie de estructuras vacuolares, que a veces aparecen vacías y sin embargo otras muestran un contenido más o menos heterogéneo en su interior, podrían representar espacios anteriormente ocupados por neuronas que han degenerado y desaparecido. No obstante, los pasos intermedios del proceso de neurodegeneración no se han encontrado; de esta forma, y como los propios autores indican, el esclarecimiento de su etiología requerirá de estudios posteriores.

Resumidamente, se ha de hacer énfasis en el hecho, de que cada especie y cada zona del cerebro presenta su propio comportamiento con el envejecimiento (Haug 84), si bien, los estudios realizados hasta la fecha, parecen apuntar hacia la idea de que el envejecimiento

afecta en mayor grado a las zonas de corteza asociativa que en las de corteza primaria (Ver revisión de Kemper'84).

### 1.3-CAMBIOS GLIALES

#### *1.3.1.- Elementos constitutivos de la glia: Pericitos, Oligodendrocitos, Células Microgliales y Astrocitos.*

La mayoría de los estudios sobre envejecimiento en sistema nervioso central, se han centrado fundamentalmente en los cambios sufridos por las neuronas; sin embargo, a las células gliales se le ha prestado comparativamente poca atención. Esta aparente falta de interés, ha sido consecuencia del escaso conocimiento, que hasta hace muy poco, se ha tenido a cerca de su función junto a los problemas derivados de su identificación con las técnicas neurohistológicas clásicas.

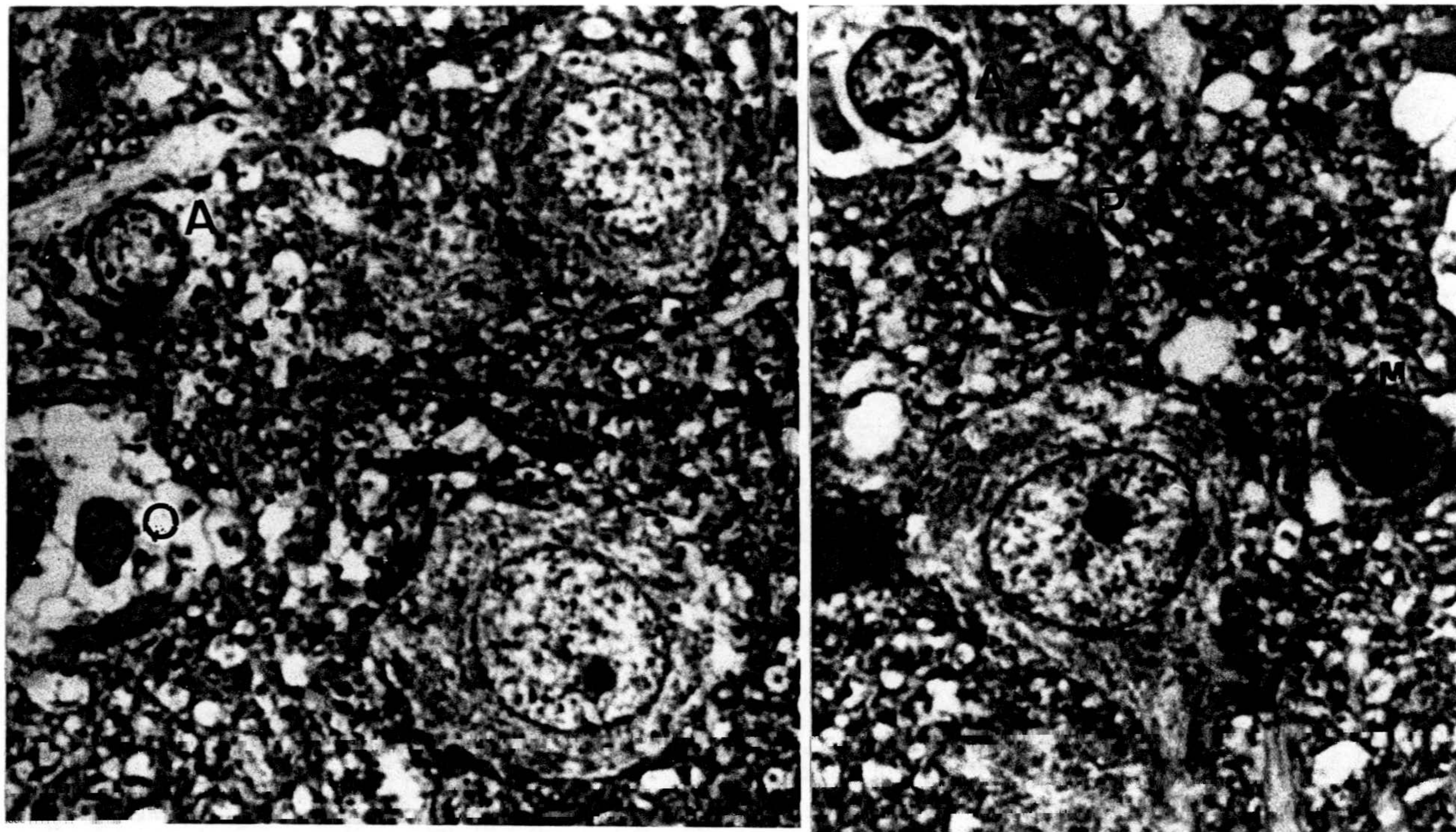
La utilización en la actualidad de nuevos métodos aplicados al estudio de la población neuroglial, está permitiendo un mejor conocimiento de estas células. Tal es el caso de los cultivos de tejidos y las técnicas autoradio-gráficas en cuanto al establecimiento del papel funcional de la glia dentro del sistema nervioso. Por otro lado, los métodos de perfusión-fijación junto a las técnicas de inmunocitoquímica y a los estudios de histología cuantitativa, están permitiendo demostrar que las células neurogliales no constituyen una población estática. De hecho, se ha podido saber que se trata de células que están sometidas a cambios desde las primeras etapas del desarrollo hasta la senectud (Dalton y col'68, Korr'78; Sturrock'80; Tardy'91). Investigaciones recientes sobre el tema sugieren que tales cambios son consecuencia del papel que desempeñan estas células en los procesos de regeneración y renovación del tejido nervioso (Castellano y col'91; Lindsay'86)).

Estudios autoradiográficos sugieren que tanto los astrocitos como los oligodendrocitos siguen renovándose a través de la vida (Korr'78; Korr'80) aunque todavía no está claro como tiene lugar el proceso. Se ha postulado que podría ser consecuencia de la división de células preexistentes del mismo tipo o incluso de la diferenciación de ciertas células precursoras denominadas glioblastos. Los glioblastos se localizan fundamentalmente en la zona subependimal alrededor de los ventrículos laterales y en menor grado en la sustancia blanca, pero no están en sustancia gris (Sturrock'83).

A diferencia de astrocitos y oligodendrocitos, la microglia parece ser que cesa su proliferación muy prontamente tras el nacimiento, por tanto la renovación de este tipo parece depender exclusivamente de la proliferación de sus precursores sanguíneos (Hickey y Kimura'88; Perry y Gordon'88; Perry y Gordon'89; Streit y col'88).

Evidentemente, todos estos conocimientos comienzan a arrojar luz no solo sobre las funciones generales de la neuroglia en el SNC, sino también sobre su posible papel en los procesos de envejecimiento cerebral.

En la corteza cerebral los principales tipos de células gliales que pueden encontrarse corresponden a astrocitos, oligodendrocitos, células microgliales y pericitos (Ling y Leblond'73; Sturrock '83; Vincent y col.'89). No obstante los pocos estudios realizados sobre el porcentaje que corresponde a cada uno de ellos en corteza cerebral no hacen referencia a los pericitos.



*FIGURA II.-Microfotografía tomada a nivel de la corteza frontal mostrando los diferentes tipos de células gliales, como se observan en un corte semifino teñido con azul de metileno. O: Oligodendrocito; A: Astrocito; M: microglia; P: Pericito. Aumentos*

O'Kusky y Colonnier (1982), encontraron en la corteza visual de monos, un 64% de astrocitos, un 29% de oligodendrocitos y un 7% de células microgliales. Ling y Leblond (1973), en la corteza dorsolateral de rata a nivel del quiasma óptico, encuentran que la población de células neurogliales consiste en 36% de astrocitos, 43% de oligodendrocitos y 21% de microglia. Estos mismos autores, también describen que en zonas como el cuerpo cayoso, el porcentaje de oligodendrocitos se eleva considerablemente en detrimento de los otros dos tipos neurogliales. Así pues, la proporción relativa de cada uno de estos tipos varía con la especie, la zona analizada e incluso con la edad como veremos más adelante (Peters y col'91).

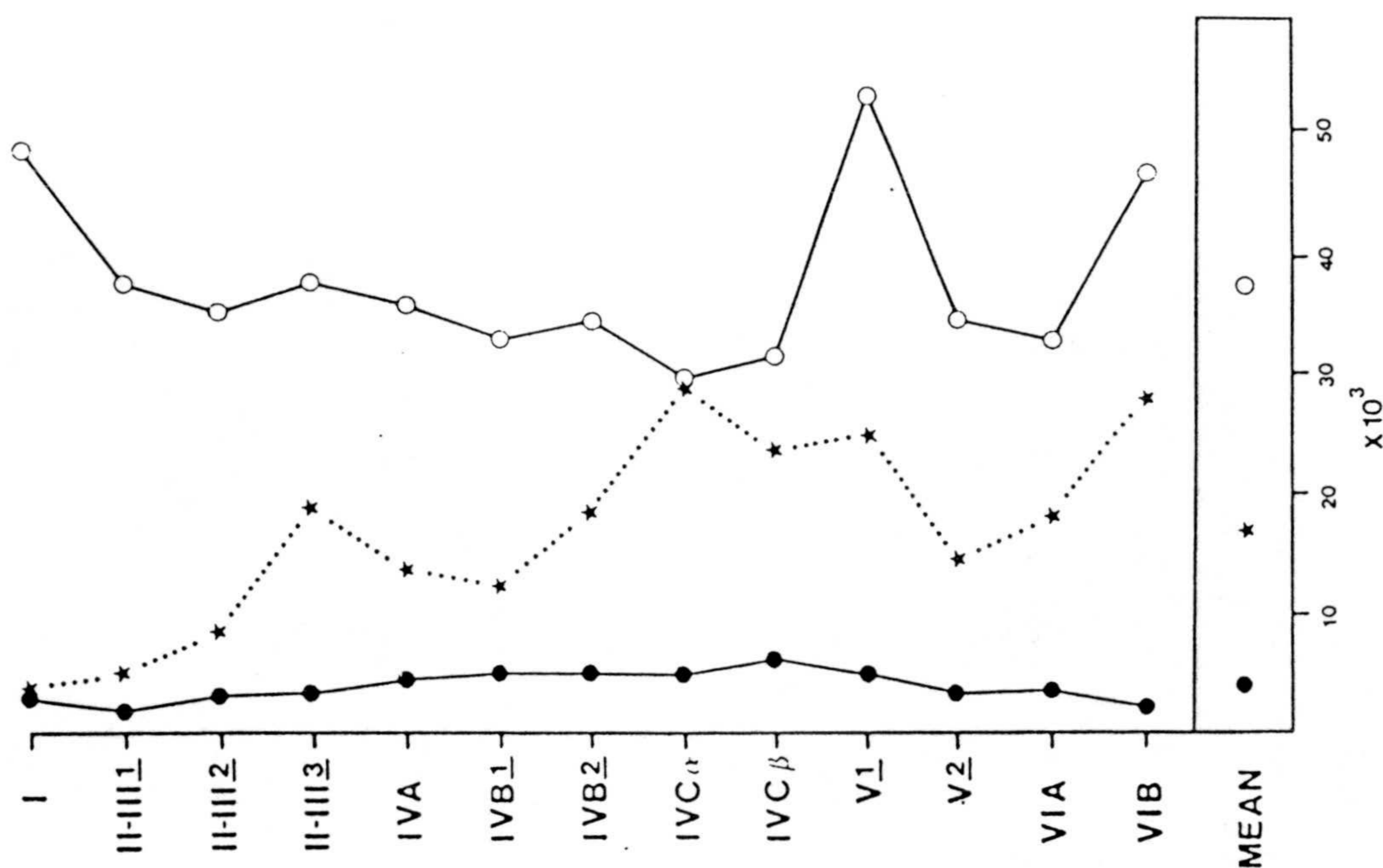


FIGURA 2I.-Número de astrocitos (o), oligodendrocitos (\*) y células microgliales (0) en las diferentes sublaminae del área 17 del mono (Tomado de O'KUSKY Y COLONNIER'82).

También la densidad global de células neurogliales varía de unas zonas a otras del cerebro. En este sentido Haug (1984), indica la existencia de variaciones comprendidas entre 14.000 y 45.000 células gliales/ mm<sup>3</sup> entre distintas regiones de la corteza cerebral humana. Estudios más recientes llegan incluso a detectar variaciones en el número de células gliales entre diferentes capas del cerebro (Peters y col'91).

También existen variaciones regionales para el ratio glia/neuronas entre diversas áreas del cerebro y diferentes especies (Peters y col'91). Así, se ha sugerido, que al comparar dicho ratio para una estructura cerebral particular, entre diferentes especies, este se incrementa con

el peso del cerebro, es decir existe mayor densidad de células gliales y menos de neuronas en cerebros pequeños como los de roedores que en cerebros voluminosos como los de primates u otros mamíferos superiores (O'Kusky y Colonnier'82).

### *Pericitos*

Son células que se encuentran rodeando los capilares sanguíneos situándose justo entre el endotelio y la membrana basal del mismo. Se disponen a lo largo de todo el sistema nervioso central, y como en otras partes del organismo parece ser que están implicados en la regulación del diámetro de los capilares sanguíneos. No parecen actuar como fagocitos (Sturrock'83; Peters y col'91).

Se ha sugerido que pueden dar lugar a células microgliales (Baron y Gallego'72; Blakemore'75; Sturrock'74) aunque estudios más recientes parecen indicar que se trata de células muy diferentes (Stensaas'75; Ling y col'80). Los pericitos con la edad, aunque también acumulan algunos gránulos de lipofuchina, se caracterizan por la presencia en su citoplasma de inclusiones que contienen un material pálido rodeado de granulaciones densas (Peters y col'91).

### *Oligodendrocitos*

Estas células se reconocen en secciones de parafina, teñidas con hematoxilina eosina o cresil violeta, por el tamaño y apariencia de su núcleo (Noetzel y Siepman'65; Penfield'24; Penfield'32; Smart y Leblond'61). La técnica del carbonato de plata de Rio Hortega (1932) permite su identificación y el estudio de su forma, aunque no son técnicas útiles para cuantificarlos. En cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, se pueden identificar por su pequeño núcleo y su citoplasma intensamente teñido (Griffin y col'72; Ling y Leblond'73; Sturrock'76) aunque en animales inmaduros durante la época de mielinización sus características morfológicas son diferentes.

Desde el punto de vista ultraestructural los oligodendrocitos presentan un citoplasma electrodensito (Imamoto y col'78; Kruger y Maxwell'66; Mori y Leblond'70; Mugnaini y Walberg'64; Peters y col'70; Schultz'64; Sturrock'74; Sturrock'76; Wendell-Smith y col'66). Las técnicas inmunocitoquímicas permiten la identificación de los oligodendrocitos tanto inmaduros como maduros. Así, la proteína W1 (proteína de Wolfgram) se ha revelado como una marca muy adecuada para la demostración de estas células (Mandel y col'78). Otra forma de marcar oligodendrocitos en maduración, es con la proteína básica mielínica (Stennberger



y col'78a y 78b). No obstante, en el caso de estudios cuantitativos de oligodendrocitos maduros, se ha utilizado sobre todo la isoenzima anhidrasa carbónica II (Ghandour y col'80).

La principal función de los oligodendrocitos es la producción de las bandas de mielina en el SNC. La estructura de las bandas de mielina del SNC fue demostrada casi simultáneamente por Peters (1960) y Maturana (1960). No obstante, desde estos primeros estudios se ha llevado a cabo una gran cantidad de trabajos sobre el tema (ver revisiones de Bunge'68; Peters y col'60). Se ha sugerido que los oligodendrocitos además de producir y mantener las bandas de mielina están implicados en el control del ambiente iónico sobre todo en lo que se refiere al transporte de agua y cloro (Langley y col'80).

Los oligodendrocitos muestran muy pocos signos de envejecimiento (Sturrock'76; Sturrock'80; Vaughan y Peters'74). En estudios realizados en cerebro de ratón se observan gránulos de lipofuchina en oligodendrocitos de animales de 12 meses de edad, sin embargo en neocórtex e indusium griseum no aparecen hasta los 18 meses de edad (Sturrock'80).

### *Células microgliales*

Se reconocen en las secciones de parafina teñidas con hematoxilina eosina y cresil violeta por su pequeño núcleo con forma de bastoncito (Noetzel y Siepmann'65; Penfield'32; Smart y Leblond'61). Robertson (1899) fue el primero que describió un método de tinción, a base de cloruro de platino, para la demostración de ciertos tipos celulares del SN que denominó como mesoglia. Penfield (1924), que tuvo la oportunidad de examinar el material original de Robertson, identificó la mesoglia como oligodendrocitos, aunque, Robertson (1900) había descrito células de mesoglia llevando a cabo procesos de fagocitosis; así pues, es posible que su técnica tiñera tanto oligodendrocitos como microglia. En secciones semifinas teñidas con azul de toluidina, las células microgliales se observan con un núcleo pequeño y oscuro, con grumos de cromatina alrededor de la envuelta nuclear (Ling y col'73). Su citoplasma muestra una serie de cuerpos densos que se tiñen intensamente de azul metalizado (Sturrock'80). Ultraestructuralmente presentan un citoplasma moderadamente denso que contiene lisosomas y un complejo de Golgi bien desarrollado (Peters y col'91).

Aunque la microglia ha sido objeto de numerosos estudios ultraestructurales a lo largo del tiempo, (Baron y Gallego'72; Ferrer y Sarmiento'80; Imamoto y Leblond'77,'78; Ling'76a, '76b,'79,'81; Ling y col'80; Stensaas'75; Sturrock'74, '76 ) solo recientemente con el empleo de modernas técnicas de marcaje histoquímico e inmunocitoquímico (Perry y col'88; Boya y col'91; Lawson y col'90; Gehrman y Kreutzberg'91; Castellano y col'91), se está empezando a conocer su origen y función.

La microglia está presente en todas las zonas cerebrales, pero no está uniformemente distribuida en todas ellas. Además, es más abundante en la sustancia gris que en la blanca

(Lawson y col'90). La corteza cerebral tiene una densidad media de microglia, que representa en torno a un 5% frente al 12% existente en sustancia negra.

Su morfología varía según su localización. Se pueden clasificar en tres categorías. La primera de ellas corresponde a células redondeadas con uno o dos brazos gruesos con pequeñas espinas, son similares a las células de Kuffer del hígado y su localización es próxima a los vasos sanguíneos situándose por fuera de la membrana basal por lo que también se han denominado como células microgliales perivasculares. Un segundo tipo corresponde a células con ramificaciones longitudinales alineadas paralelamente a los tractos de fibras nerviosas abundante en sustancia blanca. Finalmente, existe un tercer tipo de células ramificadas radialmente localizadas en el neuropilo y en la vecindad de las neuronas también denominadas perineuronales. Su diferente morfología responde a que se trata de células sensibles al microambiente (Lawson y col'90).

Todos estos tipos de células microgliales en el cerebro adulto se encuadran dentro de una variedad de microglia denominada "microglia en reposo". Cuando tiene lugar una situación de lesión cerebral, enfermedad autoinmune, enfermedad degenerativa o infección viral, proliferan y se transforman en células de "microglia activa" sufriendo cambios en su morfología e inmunofenotipo. La microglia activa puede incluso migrar, adquiriendo un papel activo en los fenómenos de reparación y restauración de las zonas lesionadas de tejido nervioso mediante la secreción de citoquinas y factor estimulante de colonias (David y col'90; Fagan y Gage'90; Gehrmann y Kreutzberg'91). La proliferación detectada en situaciones patológicas, según diferentes autores, es la consecuencia, no solo de la transformación de la microglia existente, sino además de que un gran número de monocitos sanguíneos pueden transformarse eventualmente en células de microglia activa (Imamoto y Leblond'77; Kitamura y col'72). Estas células pueden verse incluso fagocitando células degeneradas (Hume y col'83; Perry'85; Perry y col'85).

También están implicadas en la transmisión sináptica (Murabe y Sano'82a) y en los fenómenos inmunes donde actúan como células presentadoras de antígenos (Ling y col'92). Además se ha podido saber, que tanto en los fenómenos de reparación como en los de inmunidad, actúan en íntima colaboración con los astrocitos (Castellanos y col'91).

Se identifican mediante técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas. Así por ejemplo, una marca comúnmente usada corresponde a ciertos tipos de lectinas, como la isolectina GSI-B<sub>4</sub> de *Griffonia simplicifolia* y la aglutinina RCA-1 de *Ricinus communis*; ambas lectinas se unen específicamente a residuos  $\alpha$ -D-galactosa y  $\beta$ -D-galactosa de glicoproteínas de la membrana plasmática de estas células (Boya y col'91). Otra reacción histoquímica frecuentemente usada corresponde a la demostración de la enzima nucleósido difosfatasa (Castellano y col'91). Recientemente se ha utilizado como marca diferentes antisueros como el F4/80, dirigido contra una glucoproteína de su membrana plasmática (Lawson y col'90). También anticuerpos como el CR3, característico de células de la serie monocítica, marca células microgliales (Perry y

col'85; Perry y Gordon'88). Anticuerpos monoclonales como los denominados MUC 101 y 102, han sido utilizados recientemente para poner de manifiesto tanto microglia en reposo como microglia activa, el primero de ellos sobre todo en sustancia blanca y el segundo en sustancia gris (Gehrmann y Kreutzberg'91).

Sobre su origen ha habido una fuerte controversia (Boya y col'79; Jordan y Thomas'88; Konismark y Sidman'63; Ling'81) en los últimos años. Así, algunos autores, llegaron a postular su procedencia a partir de pericitos perivascuales (Mori y Leblond'69). No obstante, los estudios más recientes sobre el tema parecen indicar que se trata de macrófagos especializados del tejido nervioso de procedencia mesodérmica, como otras células fagocíticas de localización periférica (Hickey y Kimura'88; Perry y Gordon'88,'89; Streit y col'88; Boya y col'91). Durante la embriogénesis y las primeras semanas de vida postnatal, numerosas células ameboides de aspecto redondeado procedentes de la capa de tejido conectivo meníngea y del cavum septum pellucidum, se desarrollan en células microgliales (Boya y col'91). Estas células, que podrían corresponder a monocitos precursores, segregan factores de crecimiento y citoquinas que ayudan a los fenómenos de gliogénesis y angiogénesis que tienen lugar en este periodo del desarrollo (Guilian y col'88).

Las células microgliales acumulan una gran cantidad de gránulos de lipofuchina con el envejecimiento (Vaughan y Peters'74).

### *Astrocitos*

En animales adultos los astrocitos se pueden reconocer en las secciones de parafina teñidas con hematoxilina eosina o cresil violeta por sus núcleos pálidos y relativamente grandes si se comparan con las demás células neurogliales (Penfield'24; Penfield'32; Smart y Leblond'61). Cajal (1913) demostró con éxito astrocitos con el método de cloruro de oro sublimado; esta técnica permite observar la estructura completa de estas células que muestran forma estrellada con un soma circunscrito al núcleo, del que parten una serie de prolongaciones en sentido más o menos radial. Con esta técnica y desde un punto de vista morfológico, clásicamente se diferenciaron dos tipos de astrocitos; los denominados protoplasmáticos, de localización preferente en la sustancia gris, y los fibrosos localizados en la sustancia blanca. En cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, los astrocitos presentan un núcleo pálido con una serie de cromocentros debajo de la cubierta nuclear que hacen a esta muy patente; asimismo, su citoplasma es bastante claro en relación al de las otras células neurogliales (Griffin y col'72; Ling y col'73; Mori y Leblond'69). Los estudios ultraestructurales revelan la presencia en su citoplasma de numerosos microfilamentos denominados gliofilamentos que se extiende por soma y prolongaciones además de gránulos de glucógeno (Mori y Leblond'69; Mugnaini y Walberg'64; Peter y col'70; Schultz'64).

La presencia en los gliofilamentos de los astrocitos de la proteína fibrilar ácida (GFAP) permite su identificación mediante técnicas de inmunotinción. Estas técnicas utilizan un anticuerpo dirigido contra dicha proteína que marca tanto el soma como las prolongaciones del astrocito, por lo que se ha revelado como uno de los métodos más eficaces y por consiguiente más utilizados para su identificación (Bignami y Dahl'74; Fleischhauer y Hillebrand'66; Schipper y Mateescu'91; Björklund y col'85; Tamaka y col'91; Mathewson y col'85; Jacque'91; Shimada'92). Asimismo, se han sugerido otras marcas que permiten la identificación de los astrocitos mediante inmunocitoquímica, tal es el caso de la glutamina sintetasa (David y col'73) o la  $\alpha\alpha$ -isoenzima de enolasa (Langley y Ghandour'81). Más recientemente, también se ha utilizado como marca un anticuerpo dirigido contra una proteína citoplasmática que une calcio denominada S-100 y que se localiza exclusivamente en los astrocitos (Tanaka y col'91).

Los astrocitos no son un tipo celular único; se trata de una gran familia de células que presentan fenotipos diversos y especificidad funcional. Constituyen subpoblaciones que difieren por el tipo de receptores que contienen sus canales iónicos, sus sistemas de transporte activo y sus antígenos de superficie (Tardy'91). La denominada glia radial como células astrocitarias precursoras, los astrocitos de Golgi-Bergman, los astrocitos de la glándula pineal, los pituicitos y los astrocitos perinodulares, son algunas de las subpoblaciones que constituyen esta gran familia (Tardy'91).

Recientemente en cultivos primarios (Inagaki y col'91) se ha demostrado que los astrocitos constituyen dos poblaciones diferentes. Los denominados astrocitos tipo I que no presentan prolongaciones y que constituyen la subpoblación predominante; y los astrocitos tipo II, con prolongaciones y que constituyen una población muy pequeña. Además de en su morfología, ambos tipos difieren en su antigenicidad, línea de desarrollo y expresión de canales iónicos (Inagaki'91).

Los astrocitos están presentes en todo el SNC, pero su densidad varía considerablemente de unas zonas a otras del cerebro y con la especie (Tardy'91).

Las funciones que estos diferentes tipos de células astrocitarias no han hecho más que comenzar a conocerse. Clásicamente se les ha implicado en el control de la barrera hematoencefálica. Relacionados por uniones tipo GAP forman un sincitio anclado desde las superficies ventriculares hasta la pia y los vasos sanguíneos. Este sincitio que rellena los espacios entre prolongaciones y terminaciones nerviosas controla la concentración de neurotransmisores e iones en el espacio extracelular. Así, se sabe hoy día que los astrocitos más que un simple soporte a la estructura del tejido nervioso, desarrollan una muy importante función en los procesos de homeostasis del SNC, especialmente en la captura de  $K^+$  del fluido extracelular (Tardy'91). Asimismo, están implicados en el metabolismo de una serie de aminoácidos neurotransmisores excitatorios tales como el glutámico (Faivre-Bauman y col'74; Hamberger y col'78; Henn y col'74, Hertz y col'77; Quastel'78), inhibitorios como el

GABA (Schousboe y col'77; Kelly y Dick'78; Schousboe y Hertz'81) así como de taurina y aminas biógenas (Tardy 91).

Se ha sugerido que los astrocitos junto con las células microgliales, se encargan de eliminar los acúmulos de lipofuchina de las neuronas (Brizzee y col'75; Brizzee y col'74; Glees y Hasan'76; Sturrock'80) junto a la realización de fenómenos fagocíticos (Mathewson y Berry'85). No obstante, faltan evidencias directas que demuestren fehacientemente esta función, aunque si parece estar probado que segregan factores capaces de afectar a la supervivencia y maduración de la microglia (Tardy'91).

También, se sabe que aseguran la supervivencia de las neuronas y el crecimiento de sus árboles dendríticos mediante la secreción de factor de crecimiento nervioso (NGF) y otros factores neurotróficos (Mattheissen y col'89; Patel y Hunt'89; Hayashi y col'88). En este sentido, son los encargados de favorecer la migración de las neuronas sirviendo de guía para el crecimiento de los axones (Tardy'91).

Así pues, los astrocitos responden a estímulos reguladores que son responsables de la adaptación funcional, de los cambios morfológicos, de la proliferación...(Tardy'90). Poseen receptores en sus superficie (Murphy y Pearce'87) que son homólogos a los de las neuronas y que transmiten información a mensajeros intracelulares como el AMP<sub>c</sub>. A través de estos mensajeros, se puede inducir glucogenólisis astrocitaria para proveer de sustratos a las neuronas, modular la fosforilación de GFAP para cambiar la forma de la célula, o segregar factor de crecimiento nervioso e interleukinas (Inagaki y col'91).

Con el envejecimiento los astrocitos acumulan lipofuchina, si bien la edad a la que tales gránulos aparece difiere en función de la zona del cerebro de que se trate (Brizzee y col'74; Sturrock'80; Vincent y Peter'89).

Como se desprende de la revisión realizada acerca de los diferentes tipos de neuroglia, del conjunto de células que la integran merecen una atención especial los astrocitos ya que posiblemente junto con las células microgliales jueguen un muy importante papel en los procesos de restauración y reparación del tejido nervioso, tanto en los casos de lesión como en los casos de neurodegeneración subyacente a los procesos de envejecimiento de los que nos ocuparemos posteriormente.

### *1.3.2.- Alteraciones durante el envejecimiento de la población glial*

También el debate acerca del comportamiento de las células gliales con el envejecimiento se encuentra abierto en la actualidad. Así, por un lado, ciertos autores describen fenómenos de gliosis reactiva, que implican aumento de la población neuroglial (Ordy'75). Por el contrario, existen otra serie de autores que están a favor de la estabilidad (Curcio y Coleman '82; Haug y col'84). Existe un tercer grupo que llegan a resultados variables en función de la zona estudiada y la edad. Este es el caso de los estudios de Sturrock (1980) llevados a cabo en neocórtex, indusium griseum y comisura anterior de ratones viejos, utilizando cortes semifinos teñidos con azul de toluidina; en neocórtex encuentra pocos cambios en el número de células neurogliales entre los 9 y 22 meses, con la excepción de un ligero incremento en el número de células microgliales entre los 18-22 meses. En el Indusium griseum, en donde había una pérdida significativa de neuronas entre los 18 y 22 meses, se encontró también un aumento significativo de astrocitos y células microgliales durante el mismo periodo. En los dos brazos de la comisura anterior se observó entre los 9 y los 18 meses de edad una pérdida de oligodendrocitos, pero sin embargo estos aumentaron ligeramente entre los 18 y los 22 meses de edad; respecto a los astrocitos en esta zona, se observó un ligero decrecimiento de los mismos entre los 9 y 18 meses mientras que la microglia aumentó ligeramente entre los 18 y los 22 meses de edad. Lanfield y col (1977) encuentran hipertrofia de astrocitos y astrogliosis en el hipocampo de ratas de edad. Unsworth y Fleming (1980) encuentran alteraciones en la densidad de astrocitos, en el tallo cerebral pero no en el cerebelo, de ratas y ratones de edad.

También a favor de la proliferación glial, existen datos indirectos que se refieren al metabolismo de algunas sustancias neurotransmisoras y metabolitos. Tal es el caso del aumento descrito en la captación de glucosa (Strong y col'84; Shimada y col'91) o en la actividad de la glutamina-sintetasa (enzima localizada exclusivamente en los astrocitos) (Cao y col'85). Ambas situaciones están relacionadas con la edad y podrían reflejar un aumento de la población de células gliales.

En cualquier caso, existe un amplio debate sobre el tema probablemente debido a la irregularidad de los estudios realizados, que llegan a resultados variables según la zona investigada (Haug y col'83), como al método de estudio (Haug'84; Sturrock'83; Cragg'75; Vincent y col'89) y al modelo animal objeto de la investigación (Curcio y col'82; Coleman y Flood'87).

En corteza, los datos disponibles sugieren que el número de células gliales se incrementa con la edad, aunque no está claro como afecta a diferentes zonas corticales y que tipo o tipos neurogliales se ven sometidos a tal aumento. Así, Breezee (1975) en un estudio realizado en cerebro de monos sobre secciones de parafina teñidas con cresil violeta, encuentra que la población de células gliales en las áreas 1, 3 y 4 de Brodman, se incrementa en torno a un 30 % en los individuos viejos respecto a los jóvenes. Terry y col (1987), usando un sistema combinado de recuentos manuales y automáticos, encuentra con la edad en cerebro humano, un aumento significativo del número de glia en la corteza frontal media, algo menor

en el giro superior temporal, y nada significativo en el área parietal inferior. Sin embargo se ha de mencionar que en este estudio, las células gliales, no fueron caracterizadas sino que se cuantificaron dentro de un grupo de células pequeñas cuyo diámetro estaba comprendido entre 5-20 $\mu$ . Por el contrario, Haug (1984), en un estudio llevado a cabo utilizando un sistema de recuento automático, llega al resultado de la no existencia de cambios aparentes en la población neuroglial de las áreas frontales y visuales del cerebro humano.

En cualquier caso, existen otra serie de estudios que hacen referencia a cambios de la población neuroglial con la edad, especificando que tipo o tipos, son los que se ven mayormente afectados. No obstante para la certera identificación de los mismos, comúnmente en cortes semifinos o ultrafinos, se requiere la adecuada preparación del material mediante perfusión-fijación, por lo que este tipo de estudios solo están disponibles en animales de experimentación.

Brizze y col (1968), en estudios llevados a cabo en el área 2 de Krieg (1946) de la corteza de rata, encuentran un ligero incremento en el número de astrocitos y oligodendrocitos pero no en las células microgliales. Diamond y col (1977) en la corteza medial occipital de rata encuentran que la población de astrocitos y oligodendrocitos decrecen entre 1.3 y 2.5 meses de edad y permanece estable hasta los 21 meses de edad. Vaughan y Peters (1974) en un estudio ultraestructural, llevado a cabo en corteza auditiva de rata, encuentran que el incremento de la población de células neurogliales está restringido principalmente a las células microgliales. De esta forma, encuentran un 51% de astrocitos, un 31% de oligodendrocitos y un 18% de células microgliales en jóvenes mientras que en viejas detectan un incremento en el % de células microgliales en torno al 65%. En otro estudio similar realizado en el área 17 de la corteza visual de monos, Peters y col (1991), encuentran en jóvenes porcentajes del 35,1 % de astrocitos, 57,3 % de oligodendrocitos y 7,6% de células microgliales. En viejos también observan un incremento restringido exclusivamente a la población de células microgliales que estiman del orden del 44%

Así pues, las evidencias que muestran los diferentes estudios realizados desde el campo de la ultraestructura e histología cuantitativa, parecen indicar como se apuntó anteriormente, que aparte del acumulo generalizado de lipofuchina en todos los tipos gliales, las variaciones en número que sufre la población de estas células varia considerablemente entre especies y zonas cerebrales.

Lo que puede deducirse de la revisión realizada es que son los astrocitos junto a la microglia los principales tipos gliales que podrían verse implicados en los fenómenos de envejecimiento dada su probada capacidad de reacción en situaciones patológicas y neurodegenerativas (Cras y col'91; Miyazono y col'91; Hajós y col'90; Mathewson y Berry'85; Tanaka y col'91). Concretamente la existencia de un cierto aumento en el número de células microgliales en todas las zonas estudiadas, podría ser relacionado con la necesidad de retirar los acúmulos de lipofuchina de todas las demás células nerviosas. Otra posible causa

de este incremento podría ser explicada como una reacción a las lesiones o la muerte neuronal que acarrea el envejecimiento. Por su parte, los cambios sufridos por astrocitos y oligodendrocitos, parecen estar asociados más directamente con la muerte neuronal y la degeneración axónica y dendrítica propias del envejecimiento, por lo que las zonas con mayor degeneración neuronal mostrarían así mismo mayores cambios respecto a la población de ambos tipos gliales.

#### 1.4-NEUROPILO

Como se ha mencionado con anterioridad, una de las lesiones más llamativas que pueden encontrarse en el neuropilo de las zonas afectadas por el proceso de envejecimiento son las **placas seniles o neuríticas**. Se localizan sobre todo en corteza frontal e hipocampo (Dustin y col'92). Presentan un diámetro de 20-25 $\mu$ m y consisten en una agrupación de terminales degenerados (axonales o dendríticos) que rodean un grupo de filamentos proteicos extracelulares, constituido básicamente por " $\beta$  amiloide". Estas placas, se han encontrado en cerebro humano primates y otras especies como el perro y el oso polar, sin embargo no se han mostrado en rata. Se acumulan con la edad (Dayan'70; Price'91) y aparecen de forma característica en la enfermedad de Alzheimer (Katzman y col'89; Selkoe'91; Musulan y col'88). El amiloide es una proteína con un alto grado de estructura  $\beta$  en lámina plegada. El gen del amiloide se transcribe en el cerebro humano y de otras especies y sorprendentemente es también transcrito por las células de la mayoría de los tejidos humanos. El  $\beta$  amiloide se expresa con preferencia en las grandes neuronas piramidales de las capas III y IV de la corteza frontal y en la región CA1 del hipocampo (Katzman y col'89; Selkoe'91; Mesulan y col'88).

Con el envejecimiento normal, también se observan en neuropilo de las regiones corticales una serie de cambios degenerativos menos aparentes que las placas seniles y que solo es posible reconocerlos a nivel ultraestructural. Estos cambios que están íntimamente relacionados con los descritos en las neuronas implican hinchamientos y varicosidades en los axones y terminaciones sinápticas de fibras inmunoreactivas a catecolaminas (Masuoka y col'79) a acetil colina (Armstrong y col'88) y serotonina (Luijtelaar y col'91).

También los estudios ultraestructurales detectan fenómenos degenerativos en los árboles dendríticos, pérdida de espinas y en general pérdida de conectividad sináptica. Así por ejemplo, en la corteza auditiva y visual de rata Peter y Vaugann (1981) encuentran pérdidas de conexiones sinápticas con la edad. En otro estudio similar llevado a cabo en corteza auditiva de rata, Vaughan y Cahill (1984), detectan en las neuronas piramidales de la capa V



## Introducción

---

árboles dendríticos menos desarrollados y con menor número de espinas que en individuos viejos.

## **2.-NEUROQUÍMICA DEL ENVEJECIMIENTO CEREBRAL**

### **2.1.-AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES Y SISTEMA NERVIOSO**

Durante los últimos años, los conocimientos acerca de la estructura y función del Sistema Nervioso Central (SNC), han experimentado un rápido y espectacular progreso. Entre los numerosos avances realizados destaca por su importancia el esclarecimiento de la fisiología sináptica. Una de las áreas de más rápido progreso en este campo ha sido, junto a los estudios en torno a la farmacología y dinámica de los receptores, la relacionada con la investigación de los neurotransmisores. Si hace 20 años era la acetilcolina, la noradrenalina y la serotonina, los únicos neurotransmisores que habían sido reconocidos como tales, en la actualidad son más de 50 las sustancias químicas que han sido identificadas como posibles mediadores sinápticos (Bloom'88).

Entre las nuevas sustancias incorporadas al grupo de los neurotransmisores, destacan los neuropéptidos (Brownstein'89) y los aminoácidos (McGeer y McGeer'89). Mientras los primeros parecen cumplir una función básicamente moduladora (Brownstein'89), aminoácidos tales como el  $\tau$ -aminobutírico (GABA), glutámico (Glu), aspártico (Asp), glicina (Gly) y

taurina (Tau) han sido propuestos como los neurotransmisores más abundantes del SNC (Fagg y Foster'83; McGeer y McGeer'89).

Sin embargo, la participación de los aminoácidos en funciones metabólicas y estructurales, además de la de mediadores sinápticos, han hecho que su estudio presente una serie de dificultades adicionales a la de otros neurotransmisores (Davison'90). Las técnicas más ampliamente utilizadas para el estudio de los aminoácidos neurotransmisores incluyen entre otras el análisis de la distribución regional (Banay-Schwartz y col'89b; Peinado y col'84), la identidad de acción y antagonismo farmacológico (Cotman y col'87), la captación de alta afinidad (Najlerhim y col'90) la liberación evocada (Dawson y col'89), las modificaciones en los niveles endógenos tras la lesión de las vías específicas (McGeer y McGeer'89; Peinado y Mora'86) y las técnicas de localización inmunocitoquímica (Kosaka y col'89).

En este contexto general, los aminoácidos con función transmisora perfilan al inicio de la década de los noventa como los neurotransmisores de la mayor relevancia, al menos en términos cuantitativos. Siendo, sin embargo, los menos conocidos, en sus aspectos funcionales, bioquímicos o farmacológicos.

### *2.1.1.-Aminoácidos dicarboxílicos*

La posibilidad de que los aminoácidos dicarboxílicos Asp y Glu actuaran como neurotransmisores surgió en los años 50, cuando se observó su potente acción excitadora sobre el disparo espontáneo de neuronas del SNC de vertebrados (Curtis y col'60). Sin embargo datos como su amplia distribución y elevada concentración en todas las regiones cerebrales, su efecto excitador sobre la mayoría de las neuronas y el hecho de que esta acción no era finalizada por acción enzimática, hacían pensar que estos efectos, inicialmente observados carecían de especificidad (Curtis'79). Actualmente el papel como neurotransmisores de los aminoácidos Glu y Asp no solo está ampliamente confirmado, sino que se supone que juntamente con el GABA son los neurotransmisores más extendidos en el SNC de mamíferos (Fletcher y Lodge'90).

La mayoría de datos que serán expuestos a continuación y que sugieren un papel como neurotransmisor para Glu son de manera general válidos y aplicables para el Asp. En la mayoría de los aspectos el Asp tiene una acción comparable al Glu aunque es generalmente menos potente (McGeer y McGeer'89). El Asp se localiza en las terminales neuronales donde es sintetizado, su estructura dicarboxílica le confiere una acción específica sobre las

membranas de las neuronas y su liberación es  $\text{Ca}^{++}$  dependiente (McGeer y McGeer'89). El Asp es captado por los mismos sistemas de alta afinidad que el Glu de forma  $\text{Na}^+$  dependiente (Balcar y Johnston'72). Hasta ahora no se han distinguido receptores específicos para el Asp, habiéndose sugerido una acción preferente sobre receptores NMDA-glutamérgicos (Cotman e Iversen'87).

Los ácidos Glu y Asp se localizan prácticamente en todas las regiones del SNC (Banay-Schwartz y col'89a; Walker'83). Esto, parece lógico dada su importante participación metabólica (Davidson'90). Sin embargo, hay variaciones apreciables entre las distintas áreas (Banay-Schwartz y col'89a).

El Glu se encuentra en bajas concentraciones en tálamo, colículos superior e inferior (Banay-Schwartz y col'89), globus pallidus y sustancia negra (Banay-Schwartz y col'89a; Ottersen y Storm-Mathisen'84). Existen mayores niveles en estriado y corteza somatosensorial y las máximas concentraciones se encuentran en el lóbulo piriforme y la corteza que rodea a la cisura de Silvio (Banay-Schwartz y col'89a).

El Asp por su parte presenta mayores concentraciones en el cerebro medio (Battistin y col'69). Siendo particularmente elevadas en algunas áreas sensoriales (núcleo trigeminal, cuerpo geniculado medial) y en el núcleo preóptico medial del hipotálamo (Banay-Schwartz y col'89a).

Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran mayores niveles endógenos de Asp en corteza frontal respecto a los de la corteza temporal, parietal u occipital y niveles de Glu similares en las cortezas parietal y frontal pero mayores en esta última que en las cortezas temporal y occipital (Peinado y Mora'86).

Los aminoácidos excitatorios Asp y Glu se encuentran en altas concentraciones en SNC cumpliendo funciones metabólicas y estructurales (Davidson'90). Así están acoplados al metabolismo intermediario de tal forma que, por ejemplo, un 40% de la glucosa cerebral es metabolizada via Glu, previa formación de  $\alpha$ -cetoglutarato (Van den Berg'70). Además ambos aminoácidos participan en la lanzadera malato/aspartato (Cheeseman y Clark'88) y el Glu junto a su amida Gln, juega un papel importante en la regulación de los niveles de amoníaco (Benedetti y col'90). Igualmente, el Glu es precursor de la síntesis de GABA (Paulsen y Fonnum'89) y es como los demás aminoácidos, excepto GABA, un constituyente básico de péptidos y proteínas (Shank y Campbell'83).

En base a los distintos papeles asignados al Glu no es sorprendente que su síntesis y metabolismo en general estén compartimentalizados siguiendo un patrón complejo (McGeer y McGeer'89). Los dos precursores más importantes desde un punto de vista general parecen ser la glucosa y el acetato (Fonnum'84). Así, la incubación de tejido cerebral con glucosa conduce fundamentalmente a la síntesis de Glu (Peinado y Myers'88a), mientras la incubación

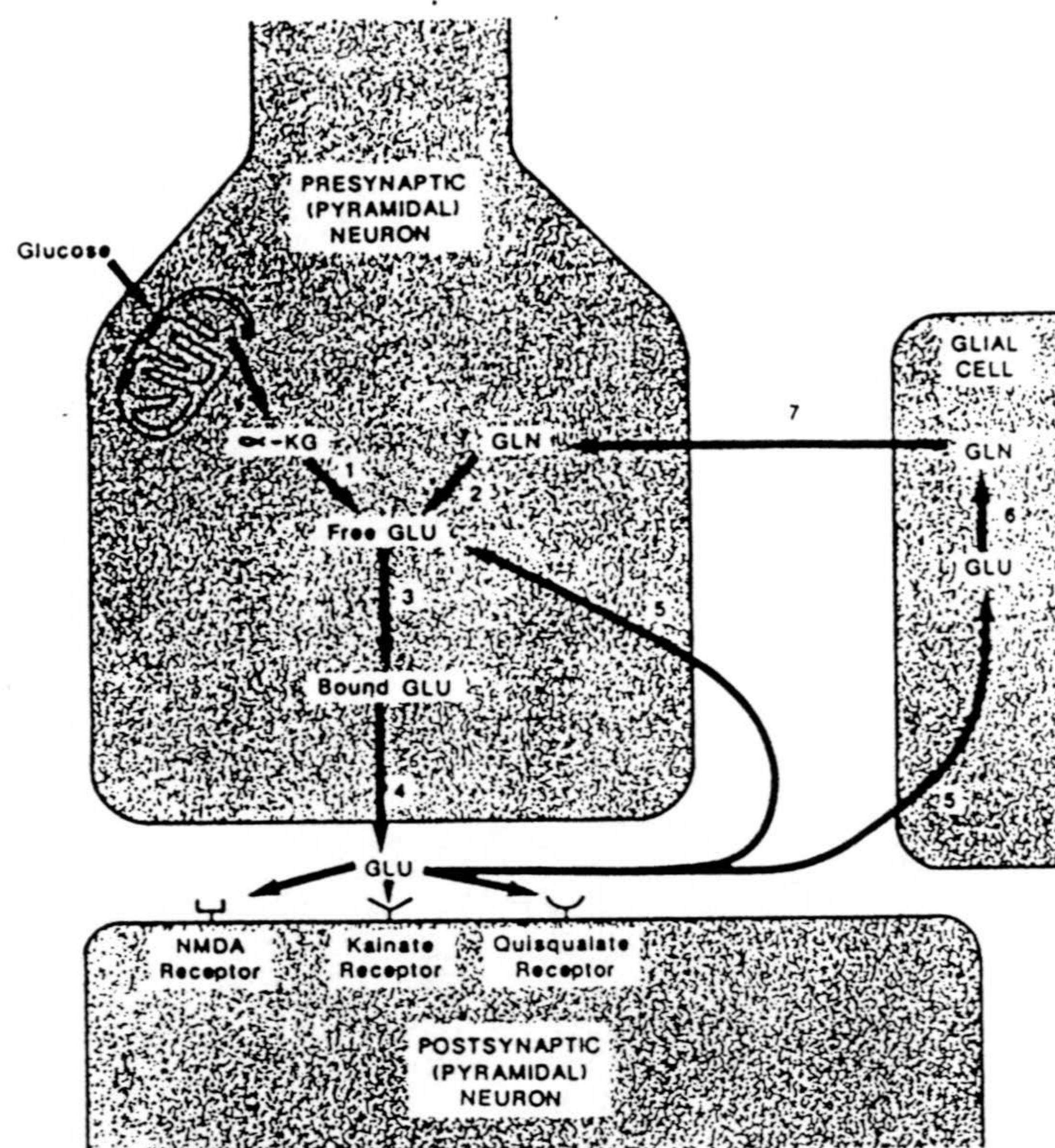
con acetato origina principalmente un aminoácido estrechamente relacionado con Glu como es la Gln (Fonnum'84). Esto ha sido interpretado como si la glucosa y el acetato estuviesen actuando en compartimientos diferentes (Fonnum'84). La glucosa sería metabolizada en un "gran" compartimento hacia Glu con escasa síntesis de Gln. Este compartimento estaría constituido por estructuras neuronales, y sinápticas (Fonnum'84). La glucosa sería transformada en  $\alpha$ -cetogluturato para rendir Glu por acción de la glutamatodeshidrogenasa (McGeer y McGeer'89). El acetato por otra parte sería metabolizado en un compartimento proporcionalmente "pequeño" con una alta síntesis de Gln (Shank y Aprison'81). El hecho de que la glutamina-sintetasa se encuentre fundamentalmente localizada en células gliales es compatible con la idea de que este "pequeño" compartimento fuese fundamentalmente glial (Fonnum'84).

El compartimento neuronal contendría entre un 85-98% del "pool" total de Glu (Fonnum'84). Esto hace necesario la subdivisión del mismo en diferentes subcompartimentos de acuerdo con las funciones metabólicas generales o propiamente neurotransmisoras de este aminoácido. La lesión experimental de las vías glutamérgicas suele acompañarse de reducciones en el contenido total de Glu endógeno en torno al 20-45%, dependiendo de la estructura que se trate (Peinado y Mora'86). Esto podría indicar el tamaño del "pool" de Glu que actúa como neurotransmisor.

Situado el marco general de síntesis de Glu los estudios de compartimentalización indican la existencia de diferentes precursores inmediatos del "pool" neurotransmisor de Glu: a) La Gln sobre la que actúa la glutaminasa (McGeer y McGeer'89). b) El  $\alpha$ -cetogluturato y Asp sobre los que actúa la aspartato-amino-transferasa (McGeer y McGeer'89). c) El  $\alpha$ -cetogluturato y ornitina sobre los que actúa la ornitin-amino-transferasa (McGeer y McGeer'89).

La glutaminasa es un enzima localizado fundamentalmente en las mitocondrias de las terminales nerviosa (Bradford y Ward'76). Su actividad se encuentra regulada por sus productos finales Glu y amoníaco (Kvamme y Olsen'80). Dado que la Gln se encuentra localizada fundamentalmente en la glia donde también se localiza la glutamina-sintetasa (Pausen y Fonnum'89) se ha propuesto la existencia de la lanzadera Gln-Glu entre glia y neuronas (Palmer y Gershon'90). El Glu liberado en la hendidura sináptica sería captado por las células gliales y transformado en Gln. La Gln por su parte sería transferida a las neuronas y transformada de nuevo en Glu (Bachelard'81).

La glucosa puede actuar también como precursor inmediato de Glu neurotransmisor a través de intermediarios como el oxalacetato y el  $\alpha$ -cetogluturato, tal como se ha comentado más arriba.

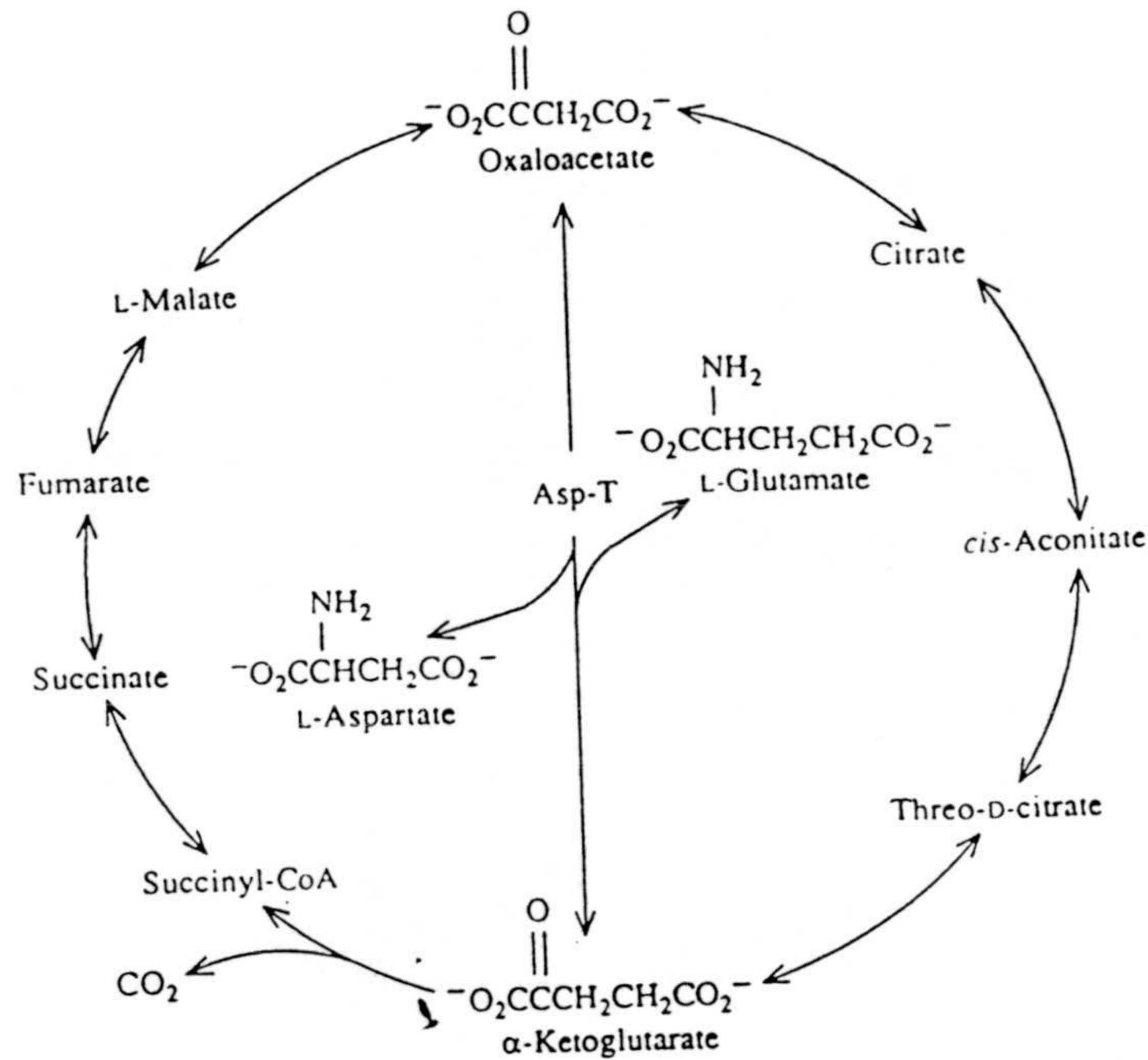


*FIGURA 3I.- Modelo esquemático de una terminal glutamérgica, mostrando la implicación de neuronas y células gliales en el ciclo del Glu (Tomado de PALMER Y GERSHON, 1990)*

Experimentos "in vitro" con doble marcaje en distintas estructuras cerebrales han mostrado que el "pool" de Glu que puede ser liberado por los terminales sinápticos procede en torno a un 66-80% del Gln y entre un 16-20% de glucosa (Fonnum'84). Por el contrario experimentos "in vivo" parecen demostrar una participación al 50% de ambos precursores (Ward y col'83).

El papel de la ornitina u otros compuestos como la arginina o la prolina en la síntesis de Glu parece ser cuantitativamente de escasa relevancia dada su baja tasa de síntesis comparada con la obtenida para Gln o  $\alpha$ -cetoglutarato (McGeer y McGeer'89).

El Asp tiene también su precursor inmediato en el Glu, formándose por transaminación de Glu con el oxalacetato y rindiendo  $\alpha$ -4-cetoglutarato y Asp (Subbalaskshmi y Murphy'85). Por otra parte, la evidencia de la síntesis de Asp a partir de Gln y/o asparragina es poco convincente (McGeer y McGeer'89).



**FIGURA 4I.-** Intermediarios del ciclo de Krebs, mostrando la formación de Glu y Asp por transaminación. (Tomado de MCGEER Y MCGEER, 1989)

Tanto las neuronas como las células gliales poseen mecanismos de "captación" de baja afinidad para los distintos aminoácidos relacionados con el metabolismo intermediario (Shank y Campbel'83). sin embargo los aminoácidos con un papel neurotransmisor poseen mecanismos de captación de alta afinidad localizados tanto en las neuronas que los liberan como en las células gliales que las circundan (Najlerhim y col'90). Precisamente la ausencia de enzimas específicos de degradación hace de estos sistemas de captación los mecanismos a través de los cuales se procede a la inactivación y terminación de la acción del neurotransmisor liberado (Hertz'79).

Los mecanismos de transporte encargados de esta captación parecen ser compartidos por el Glu y por el Asp (McGeer y McGeer'89). Dicha captación es  $Na^+$  dependiente (Fagg y Lane'79) intercambiándose dos iones  $Na^+$  por una molécula de Glu (Stallcup y col'79). La captación parece ser neuronal en un 80% (Shank y Campbel'83) y glial en un 20% (Storm-Mathisen e Iversen'79).

La lesión de vías específicas va frecuentemente acompañada de una reducción del 70-90% en la captación de Glu y Asp (Young y col'81). Sin embargo, los estudios de captación no pueden ser utilizados para distinguir entre Asp y Glu como transmisores dado que usan un transportador común (McGeer y McGeer'89). Inhibidores de la captación como L-glutamato-dimetilester (Haldeman y McLennan'73) y L o D-threo-3-hidroxiaspartato (Johston y col'80) prolongan la acción excitadora de L-glutamato.

La liberación de Glu es un proceso dependiente de la presencia de  $Ca^{++}$  en el medio extracelular (Augustine y col'87). Puede ser estimulada por diferentes métodos de despolarización como la aplicación de altas concentraciones de  $K^+$  (Dawson y col'89), veratridina (Skilling y col'88) o estimulación eléctrica (Potasner'78)

En las células gliales sin embargo, la liberación inducida por despolarización es  $Ca^+$  independiente (Duce y Keen'83).

Estudios realizados "in vitro" a nivel de diversas áreas cerebrales han detectado mayor liberación en estriado e hipocampo y menor en sustancia negra y núcleo coclear (Reubi'80).

Experimentos realizados "in vivo" han permitido comprobar la liberación de Glu y Asp sintetizados a partir de glucosa marcada en hipotálamo (Meeker y Myers'79) y corteza cerebral (Peinado y Myers'88a). En corteza cerebral de rata se ha comprobado, asimismo, la liberación de Glu endógeno tanto basal como inducida por altas concentraciones de  $K^+$  (Tossman y col'87) como tras estimulación sensorial (Dodd y Bradford'76) o farmacológica (Peinado y Myers'88b).

Las acciones de los aminoácidos excitadores parecen estar mediadas al menos, por cuatro tipos diferentes de receptores (Fletcher y Lodge'90) : a) Receptores NMDA. b) Receptores KA. c) Receptores QA. d) Receptores L-APB. Los tres primeros tipos de receptores NMDA, KA y QA se definen por la acción de sus agonistas selectivos, N-metil-D-aspartato, ácido kaínico y ácido quisquálico respectivamente, mientras que el último tipo se define por la acción de su antagonista el ácido L-2-aminophosphonobutirico (Fletcher y Lodge'90).

Una de la primeras vías en las que se descubrió el papel neurotransmisor del ácido Glu, está constituida por las proyecciones que desde la corteza motora y premotora recibe el núcleo estriado (McGeer y McGeer'89). Desde entonces la confirmación de la naturaleza glutamérgica de la vía cortico estriatal se ha realizado desde múltiples aproximaciones experimentales incluyendo estudios de captación (McGeer y McGeer'89), análisis de niveles endógenos (Peinado y Mora'86) y estudios de liberación tanto "in vitro" (Druce y col'82) como "in vivo" (Godukhin y col'80).





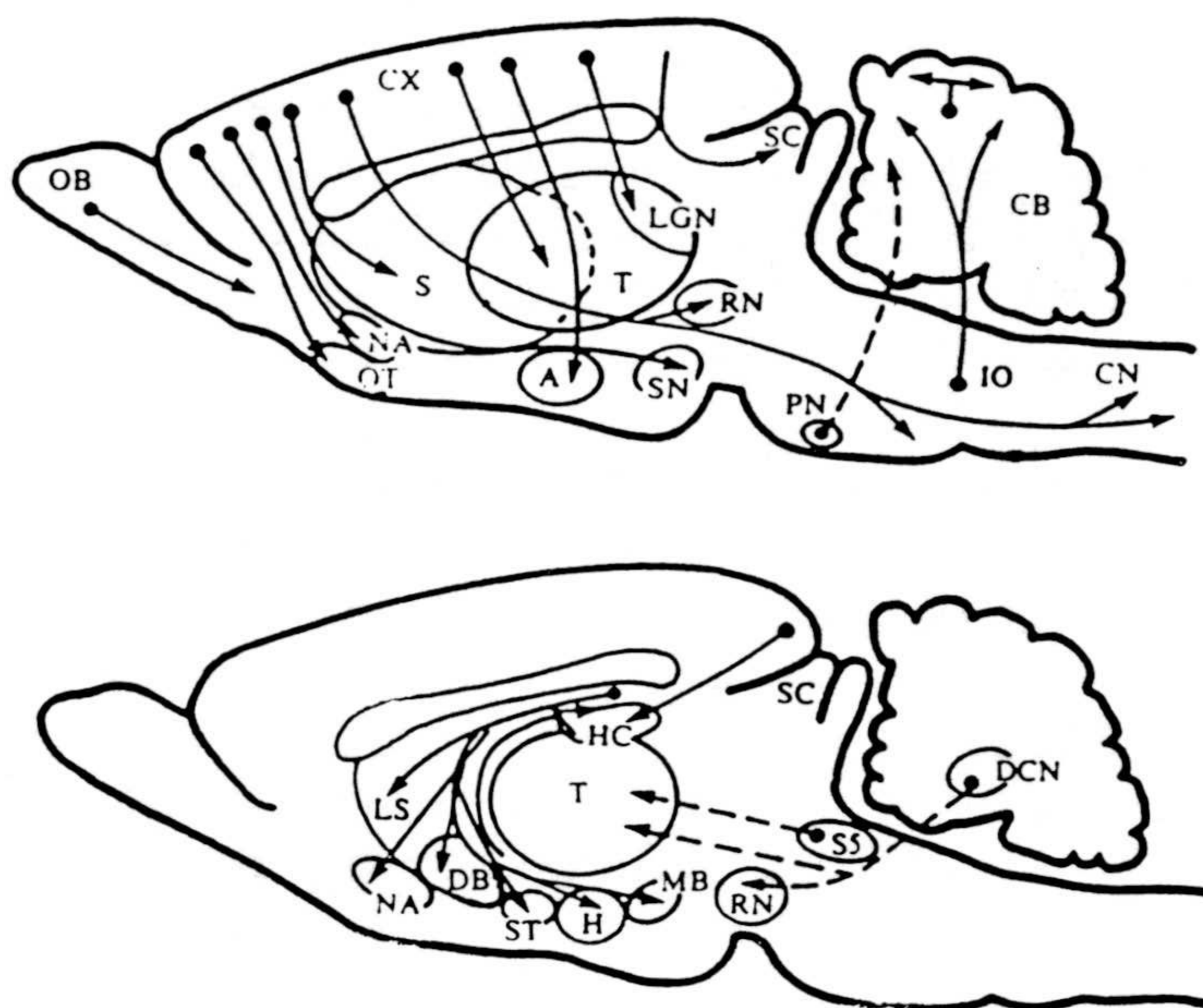
## Introducción

Otras vías cortico fugales mediadas por aminoácidos acídicos incluyen proyecciones cortico-talámicas (McGeer y McGeer'89), cortico-nígrica (Bromberg'81) cortico-corticales (Peinado y Mora'86) y vías olfatorias (Shepherd'74).

En el hipocampo han sido descritas como mediadas por estos aminoácidos la vía perforante (de corteza entorinal a hipocampo) (DiLauro'81), la fibras comisurales entre área CA4 y giro dentado (Nadler'76) y las colaterales de Schaffer desde el área CA3 a la región superior del hipocampo (Malthe-Sorensen y col'79).

En el cerebelo se ha sugerido que las fibras trepadoras podrían estar mediadas por Asp (McGeer y McGeer'89) y las fibras paralelas por Glu (Fagg y Foster'83).

También ha sido descrito el posible papel como neurotransmisor del Glu y el Asp en el nervio auditivo (Wenthold'81) y en las fibras aferentes primarias de la médula espinal (Fagg y Foster'83).



**FIGURA 5I.-** Representación de algunas vías aminoacidérgicas propuestas en el cerebro de mamífero. A (amígdala), CB (cerebelo), CN (núcleo cuneato), CX (corteza cerebral), DB (núcleo de la banda diagonal), DCN (núcleos profundos del cerebelo), H (hipotálamo), HC (hipocampo), IO (oliva inferior), LGN (Núcleo geniculado lateral), LS (septum lateral), MB (cuerpo mamilar), NA (núcleo accumbens), OB (bulbo olfatorio), PN (núcleo pontino), RN (núcleo rojo), S (estriado), SC (colículo superior), SN (sustancia negra), ST (núcleo rojo de la estria terminal), S5 (núcleo espinal del nervio 5), T (tálamo). (Tomado de MCGEER Y MCGEER, 1989).

### 2.1.2.-GABA

Es un aminoácido que se encuentra casi exclusivamente en el SNC (McGeer y McGeer'89; Tapia'83). No forma parte de proteínas, aunque se puede encontrar en pequeños péptidos como la homocarnosina (McGeer y McGeer'89).

Este aminoácido es cuantitativamente el neurotransmisor inhibitorio más importante en el SNC (Davidson'90), habiéndose postulado que puede mediar casi el 50% de las sinápsis en algunas regiones cerebrales (Iversen'82).

Aún cuando los niveles de GABA dependen esencialmente de las técnicas empleadas en su análisis, se considera al hipotálamo, sustancia negra, colículo superior y núcleo pálido como las áreas de mayor contenido endógeno de GABA (Banay-Schwartz y col'89a; Ottersen y Storm-Mathisen'84).

Los niveles de GABA en corteza son más bajos comparados con los de las estructuras citadas anteriormente aunque su distribución es muy homogénea entre las distintas áreas corticales (Davidson'90). Mediante técnicas inmunocitoquímicas y autoradiográficas se han encontrado neuronas gabérgicas distribuidas en todas las capas corticales (Kosaka y col'89). Esto, junto al hecho de que la eliminación de las aferencias a la corteza no altera los niveles de GABA o del enzima responsables de su síntesis (Emson y Lindvall'79), sugiere que el GABA cortical interviene fundamentalmente a nivel de los circuitos locales inhibitorios (McGeer y McGeer'89).

Estudios similares indican que la actividad de GABA está asociada a interneuronas en otras zonas como el hipotálamo (Barbeito y col'89), neocórtex (Davidson'90), médula espinal (Barber y col'78; McGeer y McGeer'89) e hipocampo (McGeer y McGeer'89; Oja y Kontro'83). Además, actúa como neurotransmisor en la vía estriato-nigra (Davidson'90). Estas proyecciones se originan fundamentalmente en estriado posterior y en gran parte sináptan con neuronas dopaminérgicas (Hattori y col'75) localizadas en la sustancia negra. Otra región que envía proyecciones gabérgicas a la sustancia negra es el núcleo accumbens (Waalas y Fonnum'80).

Por otra parte la primera proyección que sugirió el papel de GABA como neurotransmisor en el SNC fue la de las células de Purkinje en la corteza cerebelosa (McGeer y McGeer'89; McLaughlin y col'74). También en cerebelo el GABA parece mediar las interneuronas en cesto, células de Golgi y células estrelladas (Saito y col'74).

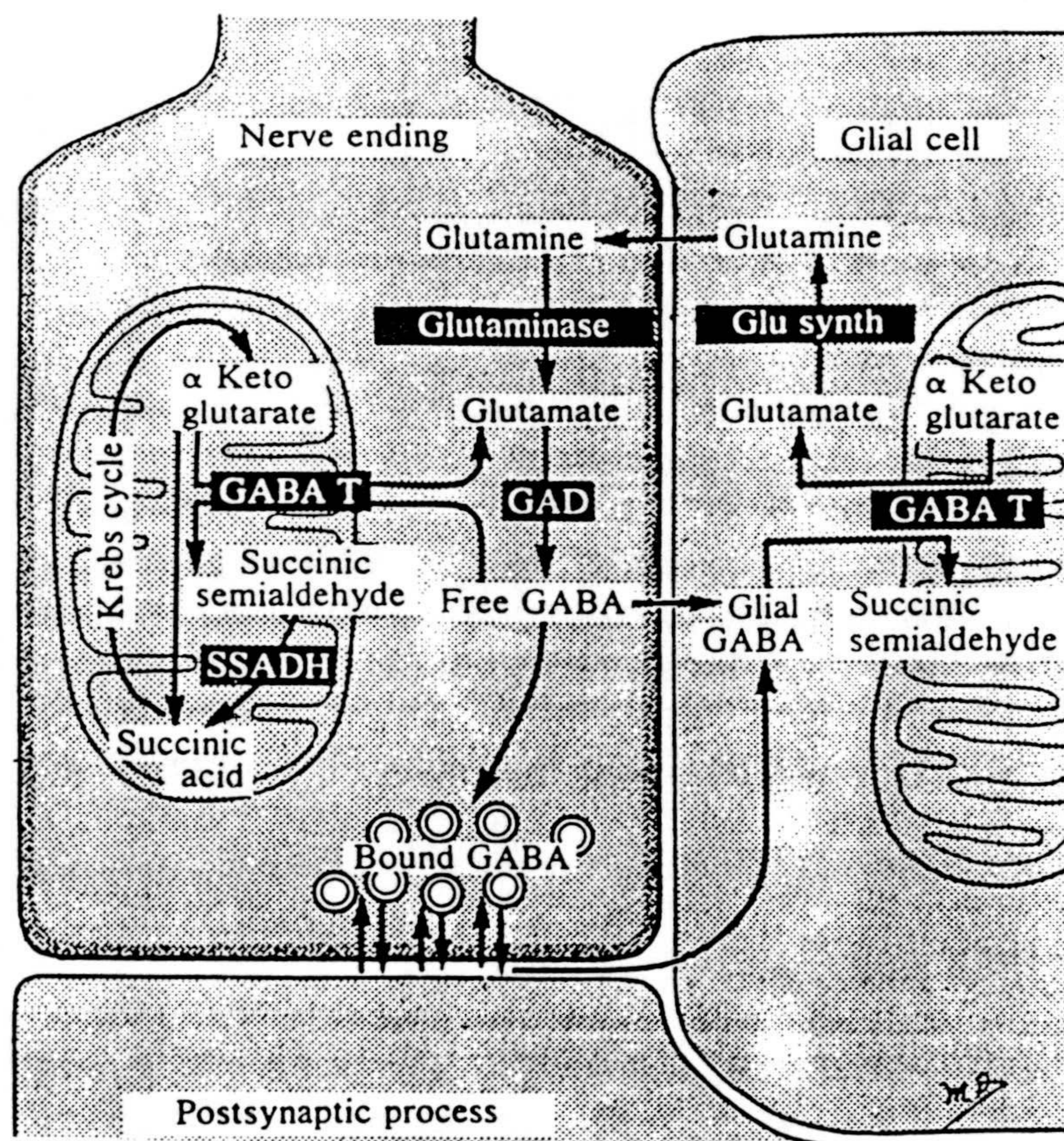
El GABA se sintetiza fundamentalmente a partir de Glu por acción de la glutamato Descarboxilasa que utiliza como coenzima el fosfato de piridoxal (Tapia'83). La glutamato-

## Introducción

descarboxilasa parece localizarse exclusivamente en las terminales nerviosas de las células gabérgicas (Barber y col'78; McGeer y McGeer'89) y es por tanto un buen marcador de las neuronas que utilizan GABA (Davidson'90).

Otras rutas alternativas de la síntesis de GABA parten de la putrescina formada por descarboxilación de la ornitina (Noto y Nakajima'86) y del  $\beta$ -hidroxibutirato (McGeer y McGeer'89).

La degradación del GABA se lleva a cabo por transaminación de este junto al  $\alpha$ -cetoglutarato por acción de la GABA-transaminasa, originándose Glu y semialdeído succínico (McGeer y McGeer'89). La GABA-transaminasa es fundamentalmente intramitocondrial y a diferencia de la glutamato-descarboxilasa se localiza en otros tejidos no cerebrales, sobre todo en riñón e hígado (Tews y col'80).



**FIGURA 6I.**- Modelo esquemático de una terminal gabérgica, mostrando la implicación de neuronas y células gliales en el ciclo del GABA (Tomado de MCGEER Y MCGEER, 1989).

El GABA se distribuye en dos compartimentos relacionados con neuronas y glia (Paulsen y Fonnum'89). En el compartimento neuronal, la Gln actúa como precursor de GABA y se convierte en Glu por acción de la glutaminasa (Paulsen y Fonnum'89). Este posteriormente se descarboxila por la glutamato descarboxilasa rindiendo GABA. En el compartimento glial, el GABA sería captado y por acción de la GABA transaminasa transformado en Glu. Este a su vez, por la glutamina-sintetasa, enzima de localización básicamente glial se transformaría en Gln, la cual sería transferida a las neuronas para comenzar de nuevo el ciclo (Nicklas y col'79).

La inactivación sináptica del GABA se realiza mediante mecanismos de captación de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  (McGeer y McGeer'89). Esta captación se realiza tanto por las terminales nerviosas como por células gliales (Paulsen y Fonnum'89), aunque los lugares predominantemente responsables de la "captación" son las terminales nerviosas de las neuronas (Ljungdahl y Hoekfelt'73).

La liberación de GABA a partir de las terminaciones nerviosas depende de la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  en el medio (Tossmán y col'87) y es incrementada por estímulos despolarizantes (Oja y Kontro'89). Experimentos "in vitro" realizados en "slices" de corteza cerebral y cerebelo han demostrado que dicha liberación puede producirse de forma espontánea o inducida por altas concentraciones de  $\text{K}^+$  (Oja y Kontro'89). Análogamente, preparaciones "in vivo" han descrito la liberación de este aminoácido, tanto de nueva síntesis a partir de precursores (glucosa) (Peinado y Miers'88a) como endógena (Farrant y Webster'89).

Los receptores del GABA se han subdividido básicamente en dos poblaciones, GABA(a) y GABA(b), teniendo en cuenta su especificidad farmacológica (Ralph y Menaker'89). Los receptores GABA(a) serían postsinápticos e interaccionan con GABA, muscinol e isoguavacina como agonistas. Estas acciones son inhibidas por la bicuculina y la picrotoxina. Por el contrario, el agonista baclofén es inactivo frente a los mismos, aunque actúa con gran potencia frente a receptores GABA(b) (Ralph y Memaker'89).

La fijación de GABA a sus receptores GABA(a) es  $\text{Na}^+$  independiente, siendo la respuesta celular a esta interacción el control de las corrientes de  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana, conduciendo a una hiperpolarización y por tanto a una inhibición postsináptica (Bradford'88a). Por otra parte, los receptores presinápticos GABA(b) estarían unidos probablemente a canales  $\text{Ca}^+$  y podrían controlar la liberación de neurotransmisores influyendo directamente en la entrada de este ión durante la despolarización del terminal nervioso (Hill y col'84).

### *2.1.3.-Taurina*

La Tau deprime la actividad nerviosa en un gran número de regiones del SNC (McGeer y McGeer'89), encontrándose ampliamente distribuida y siendo junto a Glu, Asp y GABA los aminoácidos que presentan unos mayores niveles (McGeer y McGeer'89). Las zonas del SNC en las que hay mayor abundancia de Tau son la corteza cerebral, el cerebelo, el bulbo olfatorio y el núcleo estriado (Banay-Schwartz y col'89b). Además, es de destacar su alta concentración en la retina particularmente a nivel de los fotorreceptores (Davidson'90).

El principal enzima responsable de su síntesis es la cisteína-sulfinato-descarboxilasa que actúa sobre un sustrato rindiendo inicialmente hipotaurina y posteriormente Tau, reacción esta última mediada por el NAD<sup>+</sup>. Otra parte de la Tau formada proviene del "pool" de aminoácidos sulfurados entre los que se encuentran la cisteína y la metionina (Bradford'88a). La cisteína-sulfinato-descarboxilasa se localiza en las terminales sinápticas mostrando una distribución similar a la de la Tau (Chan-Palay y col'82).

Se han descrito la existencia de mecanismos de "captación" de alta afinidad para Tau en la practica totalidad de las estructuras del SNC (Collins'74), siendo Na<sup>+</sup> dependientes y localizados a nivel de las terminales sinápticas (Schmid y col'75). No obstante, también se ha descrito "captación" de alta afinidad de Tau en células gliales (Borg col'77).

La liberación de Tau inducida por despolarización ha sido demostrada en la corteza cerebral (Oja y Kontro'89) en la retina (Oja y Kontro'83) en preparaciones "in vitro". Recientemente se ha descrito también su liberación en la corteza cerebral en preparaciones "in vivo" (Peinado y col'86). Sin embargo, la liberación de Ca<sup>++</sup> dependiente solo ha podido ser demostrada en la retina (Oja y Kontro'83).

Los efectos de la Tau parecen estar mediados por un incremento en la conductancia al ión cloruro (Agrawal y col'71). Esta acción puede ser bloqueada por compuestos como la estriocina o la bicuculina. No se conocen sin embargo, agonistas ni antagonistas para los receptores de Tau (Bradford'88a).

Por otra parte, se ha demostrado que la Tau inhibe la entrada de Ca<sup>++</sup> y facilita el acumulo celular de iones K<sup>+</sup> en tejidos como el cerebro y el músculo cardíaco (Pasantes-Morales y Moran'81). Esta influencia de la Tau sobre los movimientos del Ca<sup>++</sup> en el SNC por medio de mecanismos que no involucran receptores específicos de este aminoácido pudieran constituir la base de su acción inhibidora. Esto sugiere para la Tau un posible papel como neuromodulador más que como neurotransmisor clásico (Pasantes-Morales y Moran'81). Esta idea es corroborada por estudios autoradiográficos realizados en cerebro de no primates y que muestran una mayor localización de Tau en el cuerpo celular que en la sinápsis

(Davidson'90). Finalmente, experimentos "in vivo" utilizando un medio de perfusión hipotónico, han mostrado un aumento de los niveles extracelulares de Tau, sugiriendo la posibilidad de un papel osmoregulador para este aminoácido en los procesos cerebrales (Solis y col'88).

## 2.2. NEUROTOXICIDAD DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES

Paralelamente al esfuerzo realizado en los últimos años, para comprender el papel que los aminoácidos acídicos juegan en los fenómenos de transmisión sináptica, se ha comprobado la potente acción neurotóxica que poseen estos compuestos (Frandsen y Schousboe'90).

Olney observó por primera vez, que el glutamato monosódico, usado como aditivo en los alimentos, era la causa de que apareciesen lesiones en el hipotálamo de recién nacidos (en esta zona del cerebro la barrera hematoencefálica no ha madurado suficientemente a edades tan tempranas) (Olney'69). Posteriormente, se ha comprobado el efecto neurotóxico, que presentan no solo los propios aminoácidos excitatorios (L-Asp y L-Glu), sino además, otras sustancias relacionadas con ellos como los ácidos kaínico y quisquálico, el N-metil-D-aspartato o el ácido RS, $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropinóico (Frandsen y Schousboe'90). Efectivamente, la inyección de estos compuestos en tejido cerebral conduce a lesiones neuronales localizadas, que se producen a nivel postsináptico. De manera que hay una destrucción diferencial de las dendritas y los cuerpos celulares, mientras que los axones y los terminales degeneran más tarde (Bradford'88a).

Experimentos "in vivo" han establecido claramente que la exposición excesiva a la acción de estas sustancias puede ocasionar degeneración neuronal (Dichter y Choi'89). No obstante, algunas propiedades del tejido nervioso intacto pueden impedir una valoración precisa de este efecto tóxico. Así, la barrera hematoencefálica del adulto limita la llegada al cerebro de aminoácidos excitadores administrados sistemáticamente. Incluso, cuando dichos compuestos son inyectados directamente en cerebro sus concentraciones quedan desdibujadas, por diversos mecanismos de inactivación, tanto metabólicos como de captación (Dichter y Choi'89). Finalmente, el efecto tóxico de los aminoácidos excitadores puede aumentar por la acción aditiva de estos compuestos, pero liberados endógenamente tras la despolarización continuada de terminales aminocidérgicas (Dichter y Choi'89).

En cultivos celulares, sin embargo podemos definir precisamente la concentración de estas sustancias añadidas al medio, lo cual permite valorar mucho mejor su acción neurotóxica.

Además en estas condiciones los mecanismos de liberación o inactivación están atenuados (Dichter y Choi'89).

De hecho, en cultivos de células corticales, el Glu tras cinco minutos de exposición a una concentración 100  $\mu\text{M}$ , la cual es cien veces menor que la que se obtiene de tejido en corteza de mamífero, es suficiente para destruir la mitad de las neuronas cultivadas sin que aparezca daño alguno en células gliales (Choi'87). Otros dos aminoácidos excitadores presentes endógenamente se han encontrado en neuronas corticales y presentan una potencia tóxica similar: Aspartico (Dichter y Choi'89) y homocisteico (Kim y col'87). Otro compuesto también presente, el quinolinico, no está sujeto aparentemente a inactivación por recaptación (Stone y Connick'85) y es posible que resulte, comparativamente, tan potente como una neurotoxina cuando es inyectada "in vivo" (Schwarcz y col'83). Sin embargo, exposiciones cortas de esta sustancia en cultivos corticales presentan al quinólinico como una neurotoxina mucho mas débil que el propio Glu (Kim y Choi'87).

### *2.2.1. Mecanismos de neurotoxicidad de aminoácidos excitatorios*

Han sido descritos al menos dos mecanismos que podrían mediar, uno a corto y otro a largo plazo, la neurotoxicidad ocasionada por estos aminoácidos. El primero sería consecuencia de la entrada de  $\text{Na}^+$  y mediaría la "la excitotoxicidad" aguda. En los trabajos iniciales que caracterizaron la neurotoxicidad de aminoácidos excitadores, Olney y colaboradores comprobaron una correspondencia general entre el potencial neuroexcitador y neurotóxico de muchos compuestos (Olney y col'71). Estos autores propusieron (Olney y col'86) que la neurotóxicidad de los aminoácidos excitadores sería una consecuencia directa de la excesiva despolarización excitadora, tal vez asociada a una pérdida de la homeostasis iónica y/o a una deplección de las reservas energéticas de la célula. Esta atractiva hipótesis fue respaldada por estudios ultraestructurales, mostrando que los aminoácidos excitatorios inducían una hinchazón neuronal más marcada en dendritas y en somas (dendrosomatotóxicas) (Olney'78), probablemente mediada por la presencia de altas concentraciones de receptores postsinápticos.

Experimentos "in vitro" también apoyan la existencia de un mecanismo excitotóxico para explicar el daño neuronal inducido por aminoácidos excitadores. Cultivos de neuronas de hipocampo (Rothman'85) y neuronas aisladas de retina de pollo (Olney'86) muestran hinchazones tóxicas agudas e irreversibles tras 30 minutos de exposición a aminoácidos excitadores. Puesto que la neuroexcitación está mediada por la entrada de iones  $\text{Na}^+$ , originada por la activación química de la conductancia de la membrana (Hablitz y Langmoen '82), el daño neuronal bien podría depender de la presencia extracelular de  $\text{Na}^+$ . En efecto,

reemplazando el  $\text{Na}^+$  extracelular por un catión impermeable se bloquea la hinchazón tóxica aguda (Rothman'85). Además, la hinchazón neuronal producida por la exposición de aminoácidos excitadores puede ser mimetizada por otros agentes despolarizantes tales como altas concentraciones de  $\text{K}^+$  o veratridina (Rothman'85).

Sin embargo, algunas consideraciones sugieren que la hinchazón excitotóxica aguda, mediada por la entrada de  $\text{Na}^+$  no explica completamente los daños inducidos por aminoácidos excitadores. Primero: el rango de correlación para aminoácidos excitadores entre neuroexcitación y neurotoxicidad no es perfecto; por ejemplo, el kaínico es un potente neuroexcitante extrínseco (McLennan'80) pero es una neurotoxina débil (Choi'87) dependiente además de la presencia de proyecciones endógenas de Glu (Biziere y Coyle'78). Segundo: la neuropatología del daño neuronal por isquemia, achacada al efecto neurotóxico de aminoácidos excitadores, no se desarrolla completamente de forma aguda tras una agresión sino que más bien muestra un sustancial retraso (Pulsinelli'82). Finalmente, cuando reemplazamos el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{Cl}^-$  extracelulares puede abolirse la hinchazón neuronal aguda observada en cultivos corticales expuestos 5 minutos a Glu, sin embargo, la mayoría de las neuronas en estos cultivos sufren degeneración, aún cuando no la desarrollan hasta el día siguiente (Choi'87).

El segundo mecanismo, que actuaría a más largo plazo, estaría mediado por el ión  $\text{Ca}^{++}$  (Jancso y col'84). Es conocido que algunas toxinas provocan daño neuronal por mediación de una entrada excesiva de calcio a la célula (Dichter y Choi'89). Estudios de flujo de isótopos (Berdichevsky y col'83), electrofisiológicos (Kudo y Oka'83), de precipitación (Price y col'85) y tinción sensible a  $\text{Ca}^{++}$ , han establecido que este ión entra en la célula acompañando la acción central de los aminoácidos excitadores.

En cultivos de células corticales se han obtenido evidencias directas que relacionan al  $\text{Ca}^{++}$  con la neurotoxicidad inducida por Glu. Estos cultivos, desarrollan una hinchazón neuronal aguda después de la exposición durante 30 minutos a dicho agente (Choi'87). Sin embargo, con tiempos cortos de exposición (5 minutos) y quitando el  $\text{Ca}^{++}$  extracelular mejora considerablemente la supervivencia de las neuronas durante los días siguientes. Un efecto similar se ha descrito para el daño neuronal producido por quinolinato (Kim y Choi'87) y homocistato (Kim y Choi'87). La eliminación del  $\text{Ca}^{++}$  extracelular también reduce el daño celular producido por estos aminoácidos excitadores (Rothman y col'87).

Los aminoácidos excitadores pueden originar la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  directamente al interior celular a través de canales iónicos de compuerta química, o indirectamente a través de canales dependientes de voltaje activados por la despolarización de la membrana. Todas las subclases de receptores de aminoácidos excitadores abren canales permeables al  $\text{Na}^+$  llevando la membrana a una despolarización, y consecuentemente, a la activación de canales  $\text{Ca}^{++}$  dependientes de voltaje. Sin embargo, solo el receptor NMDA abre también canales altamente permeables al  $\text{Ca}^{++}$  (MacDermott y col'86). La importancia de los receptores NMDA como mediadores de la neurotoxicidad inducida por Glu, comparada con la neuroexcitación que



## Introducción

---

produce dicho agente, apoya la posibilidad de que el  $\text{Ca}^{++}$  entre directamente a través de la activación de canales NMDA. Esto es corroborado por observaciones en las que la ausencia de  $\text{Na}^+$  extracelular, o el bloqueo de canales Ca-dependientes de voltaje (Nowycky y col'85) origina una atenuación de la neurotoxicidad inducida por la aplicación de NMDA. Además, el mismo efecto se ha comprobado administrando antagonistas de Glu, particularmente aquellos que son selectivos frente a receptores NMDA (Dichter y Choi'89).

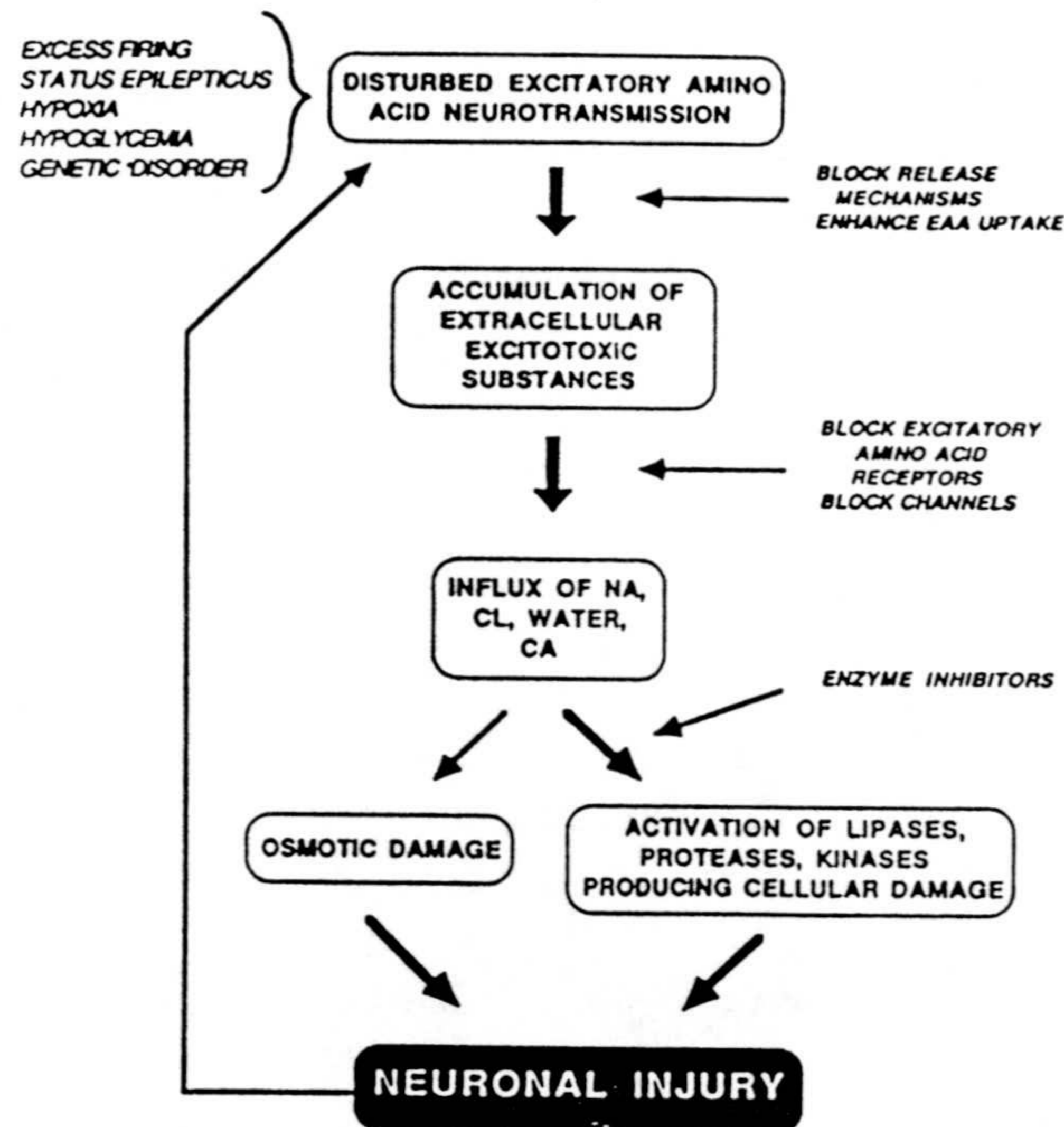
Elevaciones de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico son tóxicas por diversas razones, que reflejan alteraciones de gran número de procesos biológicos regulados por dicho ión (Siesjo'88). Entre ellos se incluyen la activación de proteasas y lipasas así como la generación de radicales libres. Además la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  en los terminales podría aumentar la liberación de aminoácidos excitadores endógenos, y propagar el daño celular mediante un retrocontrol positivo (Dichter y Choi'89).

Evidencias más recientes sugieren que los aminoácidos excitadores afectan a las neuronas, no solo a través de su acción sobre la membrana sino también activando sistemas de segundos mensajeros. La movilización de inositol-fosfato conduce a una cascada de hechos potencialmente tóxicos que incluyen liberación de  $\text{Ca}^{++}$  y de ácido araquidónico de los almacenes intracelulares (Sugiyama e Hirono'87). Esta acción no mediada por canales puede aumentar los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  citosólicos y en consecuencia sus efectos tóxicos. Sin embargo su contribución al daño neuronal no está precisamente definida.

En resumen, dos mecanismos pueden ser la base de la acción tóxica de los aminoácidos excitadores. El primero está marcado por una hinchazón neuronal que ocurre de forma aguda, es dependiente de los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  extracelular y puede ser mimetizado por otros agentes despolarizantes. La interacción de Glu con su receptor aumentaría la permeabilidad de la membrana a  $\text{Na}^+$  produciendo una despolarización que arrastraría secundariamente  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$  al interior celular. La hinchazón observada podría reflejar el aumento de volumen que llegado a un extremo produciría cambios irreversibles, así como la posterior lisis celular.

El segundo mecanismo, marcado por un retraso en la desintegración neuronal depende de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$ . De hecho este mecanismo parece ser mediado por una entrada de  $\text{Ca}^{++}$  al interior de las neuronas y puede ser mimetizado por el Ca-ionóforo A23187.

Ambos mecanismos pueden producir daño neuronal irreversible de forma independiente o asociados. Sin embargo, el mecanismo Ca-dependiente puede desencadenarse a un umbral mas bajo de exposición, y predomina en la mayoría de las condiciones patológicas. En ambos casos, el receptor NMDA, puede jugar un papel relevante en la neurotoxicidad inducida por los aminoácidos excitadores.



**FIGURA 7I.-** Esquema del mecanismo para la producción de daño neuronal, inducido por excitotoxinas. (Tomado de DICTER Y CHOI, 1989).

### 2.2.2. Neuropatología y aminoácidos excitadores

Una serie de estudios han sugerido que la acción neurotóxica producida por los aminoácidos acídicos, podría ser el posible mecanismo neuroquímico causal de algunas enfermedades neurodegenerativas del SNC (Choi y Rothman'90; Palmer y Gershon'90).

La falta de oxígeno del tejido nervioso altera la conductancia de la membrana de forma voltaje-dependiente y origina una despolarización neuronal que incrementaría la liberación de aminoácidos excitadores, a partir de sus propias terminales. Junto a ello, este proceso que afecta en términos energéticos la recaptación de esas mismas sustancias podría aumentar los niveles extracelulares de Glu y otros compuestos relacionados, propagando así la lesión celular (Choi y Rothman'90). Análogamente, pero presentando un patrón diferente de pérdida neuronal la falta de glucosa en el riego sanguíneo del cerebro va acompañada de un incremento en la liberación de aminoácidos excitadores (Dichter y Choi'89). Estudios farmacológicos, han mostrado que la administración de antagonistas de Glu o de NMDA protegen la degeneración neuronal procedente de la agresión isquémica (Choi y Rothman'90) o hipoglucémica (Dichter y Choi'89).

La vulnerabilidad neuronal o la lesión producida por aminoácidos excitadores no es uniforme. Neuronas corticales que contienen NADPH-diaphorasa, la cual se localiza con somatostatina (Koh y Choi'88a) o GABA (Tecoma y Choi'89) y neuronas estriatales que contienen acetilcolinesterasa (Koh y Choi'88b) poseen cierta resistencia intrínseca a la exposición "in vitro" con NMDA. Estas diferencias pueden contribuir al fenómeno de pérdida neuronal selectiva, un hecho de gran relevancia en la lesión neuronal debida a hipoxia o isquemia (Choi y Rothman'90).

Plaitakis y col (1982), sugirieron la posibilidad de que la atrofia oligopontocerebelosa, una enfermedad hereditaria fuera causada por un trastorno metabólico que impidiera la degradación de Glu y por tanto facilitara su acumulación en la sinápsis. Por otra parte, lesiones de las células piramidales de hipocampo de rata, inducidas por la inyección de kaínico, pueden ser un buen modelo de epilepsia en humanos. Estas y otras evidencias, que consideran a los aminoácidos acídicos, han sugerido la posibilidad de que la epilepsia pudiera estar mediada por un compuesto endógeno similar al kainato (Dichter y Choi'89). De la misma forma, inyecciones de kaínico, Glu o kinolínico en el estriado reproducen muchas de las características morfológicas y neuroquímicas de la enfermedad de Huntington (Dichter y Choi'89). Finalmente, los sistemas glutamérgicos hiperactivados pudieran ser la causa de la degeneración neuronal propia de la enfermedad de Alzheimer (Palmer y Gershon'90).

### ***2.2.3. Receptores y neurotoxicidad***

El ácido glutámico activa tanto receptores NMDA como receptores no NMDA y ambos tipos tienen capacidad para mediar excitación o producir excitotoxicidad aguda en neuronas corticales. El efecto neurotóxico puede ser atenuado añadiendo antagonistas de Glu, que actuarían como neuroprotectores (Dichter y Choi'89). En particular, aquellos que son mas

efectivos frente al receptor NMDA como la ketamina y el dextropropranolol (Dichter y Choi'89). Así, el bloqueo selectivo del receptor NMDA es insuficiente para prevenir la neuroexcitación o hinchazón aguda en el tejido neuronal sano, sin embargo permite bloquear la degeneración neuronal tardía (Dichter y Choi'89). Estas observaciones sugieren que los receptores NMDA juegan un papel importante en la pérdida neuronal de la corteza, hecho coherente con la  $Ca^{++}$  dependencia de la neurotoxicidad de Glu y en especial con la permeabilidad del canal NMDA a dicho ión. Otros aminoácidos endógenos como Asp, homocistato o quinolinato que son agonistas selectivos del receptor NMDA, también presentan antagonistas capaces de bloquear su propia neurotoxicidad.

### 2.3.- ENZIMAS PROTEOLÍTICOS. AMINOPEPTIDASAS

Los enzimas proteolíticos son aquellos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. El término es básicamente sinónimo a los de proteasas, proteinasas y peptidasas, si bien este último se refiere preferentemente a aquellos enzimas que utilizan péptidos de bajo número de aminoácidos como sustrato, mientras que los sustratos de los primeros son proteínas de mayor peso molecular.

A su vez los términos anteriormente citados incluyen indistintamente endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos distantes de los terminales amino y carboxilo de la cadena polipeptídica, mientras que las exopeptidasas rompen enlaces cercanos (uno o dos residuos) a los aminoácidos terminales.

#### 2.3.1.-Clasificación

Tradicionalmente se ha dividido a las proteinasas en endopeptidasas y exopeptidasas. Aunque esta clasificación es aún de utilidad hay que reconocer que en cierto sentido es demasiado simple. Se conoce por ejemplo que ciertas endopeptidasas son capaces de hidrolizar sustratos típicos de exopeptidasas (la leucinamida puede ser sustrato de la quimotripsina y la arginamida de la tripsina). Del mismo modo varias exopeptidasas tienen ligera actividad endopeptidásica. Tales observaciones automáticamente plantean la posibilidad de contamina-

ción en el proceso de purificación, pero en varios casos los experimentos se han llevado a cabo tan cuidadosamente que han excluido virtualmente esta posibilidad (Barret'77).

Las exopeptidasas, que requieren un grupo carboxilo-terminal no sustituido de los péptidos, se denominan carboxipeptidasas si liberan aminoácidos libres y dipeptidil-carboxipeptidasas si liberan dipéptidos intactos. Además se puede hablar de dipeptidasas y tripeptidasas, cuyo principal atributo común es su especificidad por sustratos que posean una determinada secuencia (de 2-3 aminoácidos) entre el grupo  $\alpha$ -amino libre y el grupo carboxilo libre (Cofey y De Duve'77).

### *2.3.2.-Aminopeptidasas lisosomales y citosólicas*

Son exopeptidasas que actúan sobre el terminal amino libre de una cadena polipeptídica. Dichos enzimas están ubicuamente distribuidos en la naturaleza, y su actividad puede detectarse desde en diversos microorganismos y plantas, hasta en todas las células y tejidos de los mamíferos, incluyendo al hombre. En ambos casos es un requerimiento esencial que el grupo  $-NH_2$  del residuo N-terminal se encuentre libre para poder ser reconocido por el enzima.

La especificidad de sustrato de las aminopeptidasas hasta hoy conocidas es muy variable. Mientras algunas de ellas (aminopeptidasas ácidas por ejemplo) muestran gran especificidad, otras (aminopeptidasas neutras) son poco específicas e hidrolizan una amplia gama de aminoácidos N-terminales.

Se han realizado varios intentos de clasificación de aminopeptidasas de acuerdo con diferentes criterios. Marks y Lajtha (1968a) propusieron una clasificación basada en los enzimas obtenidos de tejido cerebral y determinados con sustratos artificiales (arilamidas), clasificación que ha tenido notable aceptación. Distinguieron tres subgrupos de aminopeptidasas según la preferencia por el aminoácido N-terminal: a) Aminopeptidasas ácidas (A) que hidrolizan preferentemente aminoácidos ácidos (glutámico y aspártico). b) Aminopeptidasas neutras (N) con especial preferencia por aminoácidos neutros (por ejemplo leucina o alanina). c) Aminopeptidasas básicas (B) con capacidad de hidrólisis por aminoácidos básicos (por ejemplo arginina).

Dicha clasificación ha quedado actualmente superada debido al descubrimiento de isoenzimas dentro de cada uno de estos grupos y, sobre todo, por la aparición de otras aminopeptidasas con preferencia por la hidrólisis de determinados aminoácidos específicamente, como es el caso de la piroglutamil-aminopeptidasa o de la prolil-iminopeptidasa.

En 1977, McDonall y Schwaber, describieron las aminopeptidasas cerebrales hasta entonces conocidas, agrupandolas según su localización en los distintos compartimentos celulares.

Las aminopeptidasas citosólicas son aquellas que no requieren detergentes ni disolventes orgánicos para su extracción a partir de homogenizados de tejidos. Tampoco sedimentan en ninguna porción de los componentes citoplasmáticos de las células. Son, por tanto, solubles en disolventes acuosos y se suponen homogéneamente distribuidos en el citosol.

Además de las aminopeptidasas citosólicas existen en la célula otras aminopeptidasas localizadas en los lisosomas y en la membrana como la alanilaminopeptidasa microsomal, la arginilaminopeptidasa lisosomal y la  $\alpha$ -glutamilaminopeptidasa. Las aminopeptidasas de membrana deben ser solubilizadas mediante sustancias que disgreguen la estructura lipídica de las membranas celulares como los detergentes iónicos (Deoxicolato) o no iónicos (Tritón X-100).

Se han purificado y estudiado propiedades de numerosas aminopeptidasas citosólicas. La alanina-aminopeptidasa hidroliza residuos amino terminales con alguna preferencia por la alanina (Smith y col'65). Enzima dependiente de  $\text{Co}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}$ . No se afecta por  $\text{Mg}^{++}$ . Puede ser inhibida por EDTA y puromicina. Ph óptimo 6.9. Su especificidad por alanina no es absoluta (al igual que la leucina-aminopeptidasa), y otras aminoacil-2-naftilamidas pueden ser hidrolizadas por ella. No está claramente demostrado que sea una enzima diferente a la leucina-aminopeptidasa.

La aspartato-aminopeptidasa del citosol, es una enzima que hidroliza residuos ácidos N-terminales, preferentemente Asp (Cheung y Cushman'71). Es estimulada por  $\text{Mg}^{++}$  y no es afectada por  $\text{Ca}^{++}$  y EDTA a diferencia de la aminopeptidasa A. La aspartil-2-naftilamida es su mejor sustrato aunque también hidroliza glutamil-2-naftilamida. Es capaz de atacar el extremo N-terminal de la angiotensina II (actividad angiotensinasa) (Cheung y Cushman'71). La  $\alpha$ -glutamil-aminopeptidasa es un típico enzima microsomal solubilizable por detergentes que sin embargo se ha encontrado en suero, por lo que cabe hablar de un enzima soluble citosólico. Hay autores que opinan que este  $\alpha$ -gluAp podría tener una actuación muy similar a la AspAp (Nagatsu y col'70), o al menos, que las actividades de ambos enzimas podrían solaparse al actuar sobre sustratos iguales.

La piroglutamil-aminopeptidasa cataliza la hidrólisis selectiva de residuos piroglutamilos de péptidos y proteínas. Este enzima ha despertado mucho interés ya que es capaz de degradar péptidos "in vitro" cuyo extremo amino-terminal esté ocupado por piroglutamato (producto de la ciclación del ácido glutámico), tales como TRH, LH-RH o Neurotensina (Bauer'82).

### *2.3.3.-Aminopeptidasas cerebrales*

La aminopeptidasas cerebrales solubles fueron detectadas inicialmente por Adans y Glennes (1962), usando como sustratos aminoacil- $\beta$ -naftilamidas. Estos autores señalaron la posible existencia de isoenzimas y la característica de ser inhibidos por agentes bloqueantes de los grupos sulfhidrilos y no por agentes quelantes como el EDTA que impide la acción enzimática.

Posteriormente, Ellis y Perry (1966) comunicaron la existencia de al menos dos isoenzimas en extractos de pituitaria bovina, purificados mediante sulfato amónico y DEAE-celulosa. Uno de ellos mostraba preferencia por arginil- $\beta$ -naftilamida, y el otro por lisil- $\beta$ -naftilamida.

Otro grupo interesado por la determinación de aminopeptidasas en el cerebro fue el encabezado por Brecher y Sobel (1967) que publicaron un estudio sobre aminopeptidasas en cerebro de buey. Estos autores observaron la existencia de dos aminopeptidasas, separables mediante cromatografía en DEAE-celulosa, de las cuales, una resultaba estimulada y otra inhibida por iones  $Mn^{++}$ .

Los trabajos de Marks y col. (1968a), clasificaron parcialmente la situación al relacionar la actividad enzimática aminopeptidásica medida con di y tripéptidos naturales y con sustratos artificiales (aminoacil- $\beta$ -naftilamidas). Los autores calcularon que el 60% de las peptidasas y arilamidases se obtenían del sobrenadante resultante de homogeneizar el cerebro de rata y centrifugarlo a 30.000g durante 30 minutos. Por tanto, parte de la actividad permanecía insoluble y precipitaba tras centrifugación. Las mayores actividades en extractos cerebrales la encontraron para Ala-, Lys-, Arg- y Leu-2-naftilamida por este orden, encontrando muy poca actividad con Glu-2-naftilamida.

Técnicas de fraccionamiento subcelular mostraron que la actividad aminopeptidásica podía encontrarse distribuida por la fracción nuclear, mitocondrial, microsomal y de membrana, pero lo más interesante fue el hallazgo de una actividad de aminopeptidasa relativamente elevada a nivel de los terminales nerviosos sugiriendo por primera vez la posibilidad de que estas enzimas jugasen un papel fisiológico en la posible ruptura de péptidos (para su activación o desactivación) en la función sináptica.

Estos mismos autores (Marks y col'68b), separaron por DEAE-celulosa dos picos diferentes con actividad aminopeptidásica: uno para sustratos básicos (Arg- $\beta$ -naftilamida) y otro para sustratos neutros y básicos (Ala-leu- $\beta$ -naftilamida), junto con un tercer pico para la

denominada aminotripeptidasa, que indudablemente correspondería a alguna de las detectadas previamente por Brecher y Sobel (1967).

En 1970 Suszkiw y Brecher se hacen eco de los trabajos de Marks y col. (1968a,b) mostrando su discrepancia puesto que ellos no pudieron observar la existencia de picos adicionales en el proceso de purificación. Resultados posteriores (Iribar y col'84), sin embargo, confirman los encontrados por Marks y col (1968a,b), si bien se encontró un pico de actividad glutamil-aminopeptidásica.

En 1973, Marks y Lajtha publican su conocida clasificación de las enzimas que hidrolizan las arilamidas, sustratos artificiales. Las dividen en: a) Arilamidasa A que hidrolizaría aminoácidos ácidos. b) Arilamidasa N para aminoácidos neutros. c) Arilamidasa B para aminoácidos básicos.

En la década de los setenta, la investigación sobre aminopeptidasas cerebrales adoptó dos diferentes estrategias a veces no muy bien delimitadas. Por un lado, se abordó la caracterización y purificación de diferentes aminopeptidasas con técnicas cada vez más sofisticadas y con resultados cada vez más perfectos, con lo que se dió paso a estudios sobre su mecanismo de acción y a la búsqueda de inhibidores cada vez más específicos de estas enzimas, y por otro se abordó el estudio de la posible actividad de estas enzimas sobre péptidos biológicos (neuropéptidos) con actividad fisiológica más o menos conocida. Naturalmente este estudio no se restringió solamente a las aminopeptidasas, sino también a endo y carboxipeptidasas.

En 1977, Hayashi y Oshima purificaron 2114 veces una arilamidasa en la fracción soluble de cerebro de mono, de modo que resultara homogéneo (una sola banda) cuando se sometía a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico. Parecía que la aminopeptidasa purificada era idéntica a la encontrada por Mark y col.(1968a-b), si bien con una amplia especificidad por aminoácidos básicos y neutros. En una ampliación del estudio (Hayashi'78), se encuentra una propiedad del enzima de cerebro de primate, lo que no ocurría con la aminopeptidasa purificada por Marks y col (1968a,b).

Schenebli y col. (1979) purificaron en cerebro de rata una aminopeptidasa soluble, capaz de hidrolizar las encefalinas, similar a la encontrada en suero por Guimares y col. (1973), pero que se distinguían, de otra aminopeptidasa purificada en cerebro por Shikimi e Iwata (1970).

Una aminopeptidasa citosólica similar fue purificada por Hersh y McKelvy en cerebro bovino (1981), que los mismos autores consideraban similar a la de Schenebli y col. (1979) en rata y la de Hayashi y Oshima (1977) en macacos japoneses.



En resumen el estudio de enzimas purificados a partir de diferentes tejidos y diferentes especies muestran características contrarias a la hora de comprobar su capacidad de degradar sustratos artificiales "in vitro", lo que conlleva a confusión en lo que se refiere a equipar la actividad enzimática detectada con un determinado enzima.

### *2.3.4.- Relación de las aminopeptidasas con la biotransformación de neuropéptidos*

El descubrimiento de un número cada vez mayor de neuropéptidos ha supuesto, entre otras cosas, un nuevo impulso en el terreno de la investigación de los enzimas proteolíticos. Ello es debido a que la regulación de la actividad de estos péptidos (su activación desde pre-péptidos precursores y su degradación) debe llevarse a cabo por medio de estos enzimas cualquiera que sea su naturaleza.

En principio, tanto las aminopeptidasas como las endo y carboxipeptidasas, son posibles candidatos para llevar a cabo la hidrólisis de los neuropéptidos, pero la identificación de las peptidasas que "in vivo" realizan esta función es un problema hasta ahora desconocido, ya que solo se ha estudiado parcialmente, qué enzimas pueden efectuar "in vitro" estas funciones.

Probablemente los péptidos más estudiados en este sentido han sido las encefalinas, que pueden ser degradadas tanto por aminopeptidasas como por carboxi y endopeptidasas. Se ha descrito una aminopeptidasa soluble en cerebro de rata (Schnebli y col'79), de mono (Hayashi'78), humano (Traficante y col'80) y bovino (Hersh y col'81) y, al menos, dos unidas a membrana (Hersh'81), capaces de hidrolizar ambas encefalinas e incluso una dipeptidil-aminopeptidasa unida a membrana que liberaría el dipéptido Tyr-Gly de estas sustancias en cerebro de rata.

Las endorfinas, fragmentos de la  $\beta$ -lipoproteína ( $\beta$ -LPH), también parecen ser susceptibles de ser hidrolizadas en su extremo N-terminal por aminopeptidasas localizadas a nivel de la membrana lisosomal del cerebro de rata (Burbach y col'79). Las tres endorfinas  $\alpha$  ( $\beta$ -LPH 61-76),  $\beta$  ( $\beta$ -LPH 61-91) y  $\tau$  ( $\beta$ -LPH 61-77), tienen todas la misma secuencia N-terminal comenzando por el aminoácido tirosina. Los tres péptidos tienen actividad analgésica y la presencia de tirosina en el fragmento N-terminal parece ser esencial para dicha actividad.

Otros péptidos, además de los opioides, pueden ser susceptibles de hidrólisis por parte de las aminopeptidasas. Muchos de ellos, llevan un resto de piroglutamato en su extremo N-

terminal (Bombesina, Eledoisina, Fisalaemina, Gastrina, LH-RH, Neurotensina, TRH), los cuales pueden ser degradados, al menos "in vitro", por una piroglutamato-aminopeptidasa que se ha demostrado existe en el SNC y en sangre periférica (Bauer'82).

Los péptidos oxitocina y arginina-vasopresina, que parecen modular diversas funciones cerebrales, pueden ser degradados primordialmente por aminopeptidasas y, sus productos de degradación, parecen tener también actividad central. Tal degradación se ha demostrado que ocurre en preparaciones de membranas sinápticas del cerebro anterior de la rata (Burbach y col'79).

La angiotensina II puede ser también degradada por la aminopeptidasa A (específica para aminoácidos ácidos, que liberaría el ácido aspártico del extremo N-terminal). Este enzima ha sido purificado por Kelly y col (1983), en cerebro de ratón, aunque manifestaba propiedades diferentes a la aminopeptidasa A de otros tejidos. El sistema de las Kininas en el SNC también puede verse afectado por el sistema de las aminopeptidasas. Camargo y col. (1972), purificaron una aminopeptidasa cerebral de conejo capaz de transformar la Kinina 11 (Met-Lys-bradiquinina) en Kinina 10 (Lys-bradikinina) y en Kinina 9 (bradikinina). La somatostatina (Marks y Stern'75) y la sustancia P (Benuck y Marks'75) aunque susceptibles de degradación por medio de aminopeptidasas, parecen ser degradados con mayor actividad por otros enzimas proteolíticos.

## **2.4.-CAMBIOS NEUROQUÍMICOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO CEREBRAL**

### ***2.4.1.-Metabolismo energético***

Las funciones cerebrales normales dependen críticamente de la capacidad de sus neuronas y glia para sintetizar intermediarios energéticos. El metabolismo energético cerebral se ha evaluado en animales y humanos para distintas edades en función de parámetros como el flujo sanguíneo cerebral y el consumo de oxígeno y glucosa. La tomografía de emisión de positrones (PTE) es una técnica no invasiva que valora el metabolismo local de glucosa en humanos (Rapoport y col'84). Tras la fosforilación de [<sup>18</sup>F,2]-fluoruro-2 deoxi-d-glucosa, esta se acumula en el SNC en proporción directa a la tasa de utilización de glucosa. Al principio los estudios con PTE habían sugerido que la razón metabólica cerebral y el flujo sanguíneo se reducían en todas partes, o al menos en algunas zonas cerebrales, a medida que aumentaba

la edad. Sin embargo, estos cambios podían deberse a la inclusión en dichos estudios de sujetos con edad avanzada que presentasen diversas pedologías. Estudios más detallados (Duara y col'84) han medido el metabolismo oxidativo cerebral en 40 sujetos sanos (21-83 años), seleccionados por tener una capacidad cognitiva excelente y no presentar alteraciones que pudieran interferir con la función cerebral. Los resultados no han mostrado variaciones significativas con la edad en dicho parámetro, cuando las medidas se realizan en condiciones de bajo estímulo auditivo y visual. Análogamente, para ratas viejas con pocos cambios neuropatológicos, solo hay leves disminuciones en el metabolismo energético, estando estas variaciones confinadas básicamente a áreas sensoriales (Cotman y Peterson'89).

### *2.4.2.- Homeostasis del Calcio ( $Ca^{++}$ )*

Es bien sabido, que el flujo de  $Ca^{++}$  y su compartimentación, influyen tanto en los acontecimientos presinápticos (liberación de neurotransmisores) como en los postsinápticos (respuestas celulares, excitabilidad y segundos mensajeros). El "pool" de  $Ca^{++}$  fisiológicamente activo es el  $Ca^{++}$  libre citosólico, que representa únicamente el 1/10000 del  $Ca^{++}$  neuronal total (Cotman y Peterson'89). Por tanto, alteraciones de la razón  $[Ca^{++}]_{\text{interno}}/[Ca^{++}]_{\text{externo}}$  podrían producir cambios nocivos en la función celular.

Durante las etapas tempranas del envejecimiento en ratones y ratas, parece producirse una disminución acusada tanto de la síntesis como de la liberación de acetilcolina (Meyer y col'84). Junto a ello y también en función de la edad, Peterson y Gibson (1983) encontraron que la entrada de  $Ca^{++}$  en sinaptosomas, disminuía durante la despolarización. Así pues, es fácil postular que los cambios en la liberación de acetilcolina podrían deberse, a una reducción en la entrada de  $Ca^{++}$  que efectarse su exocitosis. De hecho se ha demostrado, que la entrada de  $Ca^{++}$  a través de canales voltaje-dependientes disminuye durante el envejecimiento (Reinolds y Carlen'89), aunque parece ser que no hay pérdida en el número de este tipo de canales, sino más bien una reducción de su actividad (Battaini y col'82). Por el contrario, también en sinaptosomas, hay evidencias de un aumento de  $Ca^{++}$  intracelular en animales viejos (Martinez y col'87). Datos que son corroborados, al comprobarse que la deficiencia en la liberación de acetilcolina no revierte por la adición del ionóforo de calcio A23187. Esto podría indicar, que los sistemas que controlan la homeostasis del  $Ca^{++}$  pueden deteriorarse durante el proceso de envejecimiento, siendo este hecho importante, precisamente, porque un aumento de  $Ca^{++}$  intracelular puede desencadenar procesos irreversibles de daño celular. En esta misma línea, algunos estudios indican que la actividad y /o afinidad de la  $Ca^{++}$ -ATPasa de membrana plasmática y del intercambiador  $Na^{+}/Ca^{++}$  disminuyen con el envejecimiento (Martinez y col'87). Sin embargo, la deficiencia más acusada hasta ahora en animales viejos, es la que afecta al sistema de secuestro de  $Ca^{++}$  intramitocondrial (Satrustegui and col'91). Esta reducción se traduce en un cambio de la distribución estacionaria para el  $Ca^{++}$ , de forma que

su concentración extramitocondrial para la que se alcanza el equilibrio homeostático es mayor en ratas viejas (Vitorica y Satrustegui'86). La disminución de la entrada de  $Ca^{++}$  en las mitocondrias durante el envejecimiento, puede traer como consecuencia, una menor activación de la piruvato deshidrogenasa intramitocondrial (enzima regulado por este ión), hecho que podría ser el responsable parcial del defecto en la síntesis de acetilcolina.

### *2.4.3.- Neurotransmisión*

Los estudios sobre los sistemas neurotransmisores durante el envejecimiento son relativamente recientes. Sin embargo, podemos encontrar cientos de artículos que consideran detalladamente distintos aspectos de la complicada maquinaria de la neurotransmisión. En su mayor parte, están referidos a animales de experimentación y pocos conciernen directamente al hombre (Wenk y col'89). En este sentido muchos de los hallazgos obtenidos son contradictorios y gran parte de los datos disponibles sobre humanos no están corroborados. Es por tanto necesario ser cuidadosos a la hora de aceptar las diferentes hipótesis actuales.

El objetivo habitualmente perseguido, ha sido, encontrar déficit funcionales en los diversos sistemas neurotransmisores que pudieran explicar el conjunto de síntomas neurológicos que acompañan al proceso normal de envejecimiento (McGeer y col'87). Los sistemas de transmisión tradicionalmente más estudiados en este sentido, han sido los colinérgicos y los que se refieren a catecolaminas (Freeman y Gibson'87). En contraste otros neurotransmisores han sido menos intensamente estudiados. Así ocurre, con la serotonina (Godefroy y col'88) de la que solo se conocen algunos datos poco consistentes y los aminoácidos (Najlerhim y col'90). Estos últimos, han cobrado recientemente gran interés, en base al posible papel de algunos de ellos como agentes neurotóxicos responsables de procesos neurodegenerativos y muerte neuronal (Dichter y Choi'89).

La inervación colinérgica cerebral deriva fundamentalmente de las neuronas localizadas en el cerebro basal anterior, cuyos somas forman un grupo de núcleos situados entre la comisura anterior y el quiasma óptico. Dentro de este grupo, el núcleo basal de Meynert provee de inervación colinérgica al neocórtex, mientras que los núcleos septal medial y de la banda diagonal de Broca inervan el hipocampo (Berg y col'84).

En el SNC la acetilcolina es un neurotransmisor de escasa importancia cuantitativa, sin embargo se cree que juega un papel clave en la actividad intelectual, incluyendo procesos como la memoria. De hecho el tratamiento de jóvenes con escopolamina (un antagonista de receptores muscarínicos) produce déficit de memoria similares a los observados en personas mayores (Cotman y Peterson'89). Además, la respuesta de células piramidales de hipocampo a la aplicación iontoforética de acetilcolina disminuye en ancianos (Bartus y Dean'83).

Ciertas hipótesis han propuesto, que en algunas regiones del SNC como son la corteza cerebral y el hipocampo, diversas alteraciones colinérgicas podían contribuir a los déficits de aprendizaje y memoria asociados al proceso de envejecimiento. Sin embargo, los datos que vamos a exponer no pueden corroborar definitivamente tal sugerencia (Decker'87).

En este sentido hemos de indicar, que no se han encontrado variaciones significativas con la edad en el contenido endógeno de acetilcolina (Consolo y col'86) y que otros datos neuroquímicos disponibles actualmente, son controvertidos. Así ocurre por ejemplo, con la medida cuantitativa de neuronas colinérgicas presentes en el cerebro basal anterior, lugar de donde parten las mayores aferencias hacia el neocortex e hipocampo (Decker'87). Análogamente, en la mayoría de los estudios, que se refieren a la captación de alta afinidad de colina, tampoco se han descrito variaciones, si bien en algún caso se manifiesta una disminución en la dinámica del proceso (Wheeler'85).

Sin embargo por otra parte y también de forma edad-dependiente, está perfectamente definida, la disminución en la síntesis de este neurotransmisor (Decker'87), así como su propia liberación a partir de las terminales colinérgicas (Freeman y Gibson'88). Además, el número de receptores muscarínicos disminuye con la edad, mientras que la afinidad de dichos receptores parece inalterable (Cotman y Peterson'89).

En cuanto al metabolismo de la acetilcolina, hemos de precisar su rápida alteración en el tratamiento postmortem, siendo por tanto el mejor parámetro de estudio en dicho caso, el caso de la actividad enzimática (acetilcolinesterasa o colinacetiltransferasa). Sin embargo, de acuerdo con los datos antes señalados, también los valores obtenidos para las actividades enzimáticas en función de la edad son poco consistentes, aunque se deprimen marcadamente en la enfermedad de Alzheimer (Cotman y Peterson'89; Decker'87).

La noradrenalina (NA) en el SNC se origina fundamentalmente en el locus coeruleus, dando lugar a diversas vías noradrenérgicas que inervan un gran número de áreas cerebrales como corteza, tálamo, hipotálamo, hipocampo, etc.. Sin embargo, la dopamina (DA) se halla más discretamente distribuida, a través de cuatro sistemas dopaminérgicos (nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical y tubero-infundibular) (Gaspar y Berger'89).

Las neuronas catecolaminérgicas parecen ser especialmente vulnerables al proceso de envejecimiento. En este sentido, se ha comprobado en humanos, que algunas zonas específicas como son el locus coeruleus (Chan-Palay y Asan'89) o la sustancia negra (Anderson y col'83) presentan una disminución significativa del número de células. También se ha descrito una pérdida cuantitativa de neuronas catecolaminérgicas (19%) en el estriado de ratas viejas (Han y col'89).

Tanto en el neostriado de humanos (Morgan y col'87) como en el de primates (Wenk y col'89), se han detectado niveles más bajos de DA en relación con la edad. No obstante,

para la rata, si bien algunos autores han descrito descensos de DA en animales de edad avanzada (Giorgi y col'87), otros no lo han podido corroborar (Godefroy y col'88). En la corteza cerebral de la rata vieja, hay un mayor contenido de DA (Godefroy y col'88), sin embargo ha dicho nivel, se ha comprobado una disminución en primates (Wenk y col'89). También hemos de mencionar, que Godefroy y col.(1988) han mostrado descensos de DA en el hipocampo de ratas viejas (Han y col'89).

Por otra parte, desde un punto de vista funcional se ha medido la captación de DA en el núcleo estriado de humanos, estableciéndose una reducción aproximada a un 70% de este parámetro, sin que la afinidad de dicho proceso se altere (Allard y Marcusson'89). Además, experimentos realizados "in vitro" con muestras de tejido o sinaptosomas de estriado de rata, han permitido constatar un descenso edad-relacionado en la liberación de DA, bajo condiciones de estímulo inducidas por L-dopa o altas concentraciones de  $K^+$  (Gregerson y Selmanoff'90). Por el contrario, los niveles corticales de 3-metoxitiramina (índice de la degradación extracelular de DA por actividad catecolortometiltransferasa) están elevados en animales de edad avanzada sugiriendo, un aumento de la liberación de DA en esta región cerebral (Wood y col'87).

En cuanto al metabolismo de la DA, hemos de indicar, que su síntesis disminuye de forma edad-dependiente en el estriado de la rata (Algeri y col'88). Además, análisis realizados después de evaluar el contenido de metabolitos de DA, sugieren que su degradación es más lenta en esta región, a pesar de que la actividad monoaminoxidasa no varía (Carlsson'81). Por otra parte, la probable disminución de DA y de sus metabolitos, tanto en el núcleo estriado como en hipocampo, no parece estar asociada al descenso aparente que se produce para la liberación de DA en dichas regiones, ya que los niveles de 3-metoxitiramina no se alteran.

Finalmente considerando de nuevo el neostriado de diferentes especies animales, tales como el humano (Rinne y col'90), la rata (Han y col'89) o el mono (Lai y col'87), la densidad de receptores específicos a DA disminuye con la edad sin que se vean alteradas sus afinidades. Precisamente todos estos datos están referidos, tanto a receptores D1 (asociados a adenilato-ciclasa) como a receptores D2 (autoreceptores). Sin embargo un dato discordante, muestra el número de receptores D1 aumentados en dicha región, sugiriéndose así una modesta compensación por hipersensibilidad que aparecía con la edad (Cotman y Peterson'89).

La NA comparte varios enzimas de síntesis y degradación con la DA. Por tanto, muchos de los cambios dependientes de la edad que ocurren en los sistemas dopaminérgicos también se dan con la NA (Cotman y Peterson'89).

En diversas especies animales, se han descrito descensos edad-relacionados, para las cantidades absolutas de NA en áreas tales, como el hipotálamo, tronco del encéfalo, estriado o hipocampo (Wenk y col'89; Carlsson'85). Sin embargo a nivel cortical, se han observado

aumentos, tanto en los niveles de NA como en la actividad tirosin-hidrolasa (Harik y McCracken'86).

Por otra parte, el hipotálamo de ratas viejas presenta frente a las jóvenes, una inhibición específica del proceso de captación para la NA así como un descenso de la liberación inducida (McIntosh y Westfall'87). Además, en esta misma zona, dichos animales han mostrado una reducción de la actividad tirosin-hidroxilasa (Simpkins y Millard'87). También, aunque en este caso para el hipocampo, se ha comprobado en animales de mayor edad un incremento más acusado en la síntesis de NA, después de una situación de stress (Algeri y col'88). Por último, indicaremos una disminución edad-dependiente, de lugares específicos de unión para NA en el locus coeruleus, hecho que no ocurre en la corteza (Wenk y col'89).

El conocimiento de los mecanismos de transmisión aminoacídica, se ha acelerado en los últimos años. A pesar de ser bien conocido que los aminoácidos forman el grupo de sustancias neurotransmisoras más abundantes en el SNC (McGeer y McGeer'89), los estudios que relacionan los aminoácidos transmisores con los procesos de envejecimiento son aún incipientes. Por tanto, los datos existentes en la literatura se presentan aún bastante dispersos, siendo en numerosas ocasiones contradictorios entre sí (Mora'88).

La mayoría de las neuronas centrales pueden ser despolarizadas por los aminoácidos excitadores Asp y Glu (Mayer y Westbrook'87), lo cual puede explicar el gran número de receptores para los mismos, distribuidos a lo largo de todo el SNC. No obstante, las zonas de mayor número de receptores son la corteza cerebral u el hipocampo (Greenmyre y Young'89). Por otra parte, está bien documentada la capacidad citotóxica que estos compuestos presentan, y en este sentido, una liberación excesiva de los mismos, podría conducir a una degeneración neuronal y en consecuencia, a la aparición de síntomas asociados a diversas enfermedades neurológicas (Dichter y Choi'89). Estas evidencias, han permitido especular con la posibilidad de que diversas alteraciones de los sistemas de neurotransmisión, que utilizan Asp o Glu, fuesen decisivas en el proceso de envejecimiento cerebral.

Davies y Himwish (1975) mostraron que los niveles de Glu y Asp en cerebro total de varias especies animales experimentaban un descenso edad-relacionado. Mas recientemente, se han observado tendencias generales a la disminución de estos aminoácidos en una gran cantidad de zonas cerebrales (Banay-Schwartz y col'89b). En esta misma línea, diversos estudios han confirmado menor contenido endógeno para la corteza cerebral (Matsumoto'82) y más concretamente en la corteza frontal (Dawson y col'89) y zonas corticales sensoriales (Banay-Schwartz y col'89b). Sin embargo, no hay modificaciones aparentes de aminoácidos excitadores en función de la edad para zonas de la corteza motora (Banay-Schwartz y col'89b). Por otra parte, datos preliminares de nuestro propio laboratorio, realizados "in vivo", muestran una disminución de la liberación de Glu en la corteza frontal, confirmando una pérdida significativa del mismo con la edad (Peinado y col'91).

Desde otro punto de vista, estudios "in vitro", comparando ratas jóvenes con ratas adultas (8-10 meses), han establecido en sinaptosomas una reducción de la captación de Glu, tanto en el estriado (Price y col'81) como en la corteza cerebral (Najlerhim y col'90), sugiriéndose así una disminución de la integridad funcional para los sistemas glutamatérgicos con la edad. Sin embargo, esto no parece ser correcto cuando se comparan ratas adultas con viejas, ya que los datos obtenidos a partir de "slices" (Dawson y col'89) o sinaptosomas (Najlerhim y col'90) en la corteza, muestran que, ni la liberación de Glu ni su captación se alteran con la edad. La estabilización e incluso el pequeño aumento en la captación de Glu para la rata vieja, podría ser el reflejo de un mecanismo de compensación a los procesos de pérdida neuronal asociados al envejecimiento. No obstante, este aumento en la captación, junto al incremento en la actividad glutamina sintetasa y ambos en relación con la edad, parecen indicar una proliferación de la glia, cuyas células no solo poseen los mecanismos de captación de Glu (Strong y col'84), sino que además contienen de forma exclusiva dicho enzima (Cao y col'85).

Por otra parte, el Glu media un alto porcentaje de sinapsis centrales, entre las que destacan, fibras de asociación intracortical y proyecciones corticosubcorticales de neuronas piramidales (White'89), que son precisamente las vías aminoacídicas más relacionadas con los procesos de aprendizaje y memoria (Greenmyre y Young'89). Estas neuronas, que constituyen aproximadamente el 70% de la población neuronal cortical, disminuyen en tamaño de forma paralela al envejecimiento cerebral (Terry y col'87) y llegan a desaparecer aceleradamente en la enfermedad de Alzheimer (Mann y col'86)

Junto a todos estos datos reseñados, el aumento de la fijación de Glu a sus receptores en hipocampo (Baudry y col'81), que podría explicarse como fenómeno compensatorio del déficit de neurotransmisores, parecen apuntar hacia un descenso de la efectividad de los sistemas neuronales mediados por Asp o Glu.

En resumen, aun existiendo datos contradictorios, es posible sugerir la hipótesis sobre la que podemos imaginar, un deterioro selectivo de los sistemas de transmisión glutamérgicos en ciertas áreas corticales de asociación en el proceso normal de envejecimiento.

En cuanto al GABA, podemos indicar que ha sido más ampliamente estudiado que los aminoácidos precedentes en relación al envejecimiento. Ello se debe, en parte, a la posibilidad de utilización de la glutamato descarboxilasa (GAD) como marcador específico de neuronas gabérgicas y su seguimiento mediante técnicas inmunohistoquímicas (Warker'83).

Estudios recientes que han medido el contenido endógeno de GABA y otros aminoácidos, han mostrado para la rata, una disminución edad-relacionada de este aminoácido en diversas regiones cerebrales (Banay-Schwartz y col'89a). Así, dos áreas como son el tálamo y la corteza cerebral, presentan un descenso de GABA relacionado con la edad, tanto en el hombre como en el primate o la rata (Allen y col'83; Banay-Schwartz y col'89a).



Además, la actividad GAD se muestra inhibida en estas mismas áreas del cerebro envejecido (McGeer y McGeer'81a). Análogamente, también se ha mostrado de forma edad-dependiente una disminución de la actividad GAD en sustancia negra, dato que podría indicar la degeneración de la vía estriatonigrica gabérgica durante el envejecimiento (Enna y Strong'81). Por otra parte, estudios en nuestro laboratorio han mostrado que la corteza frontal dorsal de ambos hemisferios, pero no la corteza orbital ni medial presentan unos niveles aumentados de GABA en la rata vieja respecto de la joven (Fornieles'86). Estos datos en un aminoácido como el GABA que actúa como transmisor inhibitorio, han sido interpretados como una posible hipofunción o freno de funciones específicas codificadas en este área del cerebro. En cualquier caso, el hecho de que en ratas viejas exista una disminución diferencial entre áreas corticales (Fornieles'86), frente a la distribución homogénea encontrada en la rata joven (Mora y col'86) habla claramente de una alteración en el mapa gabérgico de la corteza cerebral durante el envejecimiento.

#### *2.4.4. Alteraciones neuroquímicas en la enfermedad de Alzheimer*

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo de etiología desconocida. Entre sus características neuropatológicas, podemos señalar, el hecho de que algunas zonas del cerebro, como son la corteza y el hipocampo, además de acumular "placas neuríticas" y "marañas neurofibrilares" presenten una disminución cuantitativa de neuronas piramidales (Mann y col'86). La degeneración de varios sistemas neurotransmisores ha sido igualmente implicada en esta enfermedad (Palmer y Gershon'90).

En la década de los 70, se creía, que la EA se manifestaba específicamente por un trastorno selectivo del sistema colinérgico, sin embargo en la actualidad, es fácil comprender, que las alteraciones neuroquímicas que afectan a dicha patología son más complejas. Así, se ha involucrado, la neurodegeneración de otros sistemas neurotransmisores, entre los que mencionaremos los monoaminérgicos, peptidérgicos o aminoacidérgicos (Gaspar y Berger'89; Palmer y Gershon'90).

La proyección colinérgica que parte del núcleo basal de Meynert hacia corteza e hipocampo, es la más afectada durante el desarrollo de la EA. En este sentido, hay datos que indican una pérdida neuronal en dicho núcleo (Mann y col'86), así como, una disminución del contenido de acetilcolina en la corteza de estos pacientes (Francis y col'85). Además, junto a una reducción considerable de las actividades acetilcolinesterasa y colinacetiltransferasa (Procter y col'88b; Palmer y Gershon'90), se ha observado una disminución en la capacidad de síntesis de acetilcolina, tras diversos estímulos (Sims y col'83).

En cuanto al número de receptores muscarínicos, los datos que disponemos son controvertidos. Algunos autores no encuentran variaciones en la densidad de estos receptores, asociadas al desarrollo de la EA (Lang y Henke'83), mientras que otros han descrito reducciones cuantitativamente significativas en corteza e hipocampo (Van der Heyden y col'87). Probst y col.(1988), observaron que en dichas áreas, algunos pacientes de Alzheimer no presentan alteraciones significativas en el número de receptores muscarínicos. Además, cuando las había, estas no guardaban relación con la aparición de placas seniles o marañas neurofibrilares, sino con el porcentaje de pérdida celular. En este sentido, estos mismos autores han encontrado una relación receptores muscarínicos/células piramidales, notablemente incrementada, como si se tratase de un mecanismo compensatorio, que fracasaría a partir de un determinado nivel de pérdida neuronal. Por último, aunque los receptores nicotínicos han sido menos estudiados, los datos apuntan hacia una disminución de los mismos, fundamentalmente en la corteza cerebral (Whithouse y col'88).

En contra de la hipótesis colinérgica, como causa que explicaría la aparición de la EA, nos ocuparemos, no solo con el hecho de que algunos pacientes no presentan alteración alguna en el sistema acetilcolinérgico (Probst y col'88), sino que dichas alteraciones pueden aparecer en individuos sin demencia (Kish y col'88). En esta línea, podemos constatar que la terapia realizada, tanto con agonistas colinérgicos como con inhibidores de acetilcolinesterasa han fracasado (Bartus y col'83). La única excepción a este fallo, ha sido el ensayo con tetrahydro-9-aminoacridina (THA), sustancia que actuaría como un potente inhibidor de acetilcolinesterasa. Sin embargo, la THA también puede actuar como antagonista de receptores muscarínicos compensando la acción antes mencionada (Summer y col'86). Finalmente, se ha descrito que la THA interactúa con PCP (canal iónico NMDA), sugiriendo que los esperanzadores efectos terapéuticos de esta sustancia podrían ser debidos, más a una interacción aminoacidérgica que a su posible efecto colinérgico (Greemyre y Young'89).

También hay claras evidencias, de una alteración en el sistema noradrenérgico, que parte del locus coeruleus y proyecta a una amplia zona de la corteza cerebral. Se ha descrito, pérdida celular en el locus coeruleus (Mann y col'86), disminución del contenido de noradrenalina en distintas áreas corticales y subcorticales (Hardy y col'85) y descenso en la actividad de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (Perry y col'81).

Los enfermos de Alzheimer, presentan pérdidas celulares asociadas a los núcleos serotoninérgicos del Rafe, lugar que envía multitud de fibras hacia amplias zonas del neocórtex (Mann y col'86). Este dato ha sido corroborado, con la disminución en los niveles de serotonina, detectados en esta última región cerebral (Palmer y col'87).

Los neuropéptidos, también han sido implicados en la patología de esta enfermedad. El hallazgo más consistente en este sentido, nos muestra una pérdida selectiva de somatostatina en la corteza cerebral y en el hipocampo (Procter y col'88b), así como un bajo contenido de este péptido en LCR (Bissette y col'86). Además, datos inmunocitoquímicos sugieren que

las neuronas que contienen somatostatina, podrían estar relacionadas con la formación de placas neuríticas (Armstrong y col'85). Por otra parte, la caracterización de receptores a somatostatina, ha permitido comprobar que estos disminuyen en las cortezas frontal y temporal y en el hipocampo (Beal y Martin'86b).

El contenido de otro péptido como es la SP, también se encuentra disminuido en cerebros de EA, particularmente, en corteza e hipocampo (Bouras y col'90). La SP coexiste con el neuropeptido Y y la somatostatina en interneuronas corticales. Algunos autores, mantienen una posible reducción global de SP, neuropeptido Y y somatostatina en estas neuronas, deduciéndose así, que la afectación neuropeptidérgica en esta zona no es selectiva (Beal y col'87). Por el contrario, el contenido de otros neuropéptidos como el polipéptido intestinal vasoactivo, la colecistoquinina, las encefalinas o la vasopresina, no muestran variaciones durante el desarrollo de esta patología (Beal y col'87).

Recientemente los sistemas glutamérgicos, y su posible acción neurotóxica, han sido implicados en la etiopatogenia de esta enfermedad. Se ha sugerido que una hiperactividad glutamérgica pudiera ser el factor causal de la degeneración y muerte neuronal propia de la enfermedad de Alzheimer (Maragos y col'87b). De hecho los sistemas de asociación cortical, en los que sinapsan terminales procedentes de neuronas piramidales glutamérgicas están muy relacionados con los procesos de aprendizaje y memoria (Lynch y Baudry'84). Precisamente, bloqueantes específicos de receptores aminoacidérgicos disminuyen significativamente la capacidad de aprendizaje y memoria en animales de experimentación (Cobo y col'88). Durante el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, los sistemas anteriormente indicados pueden sufrir modificaciones mas o menos drásticas en sus conexiones dendríticas, alterando así la comunicación normal entre las diferentes áreas corticales. De hecho, la incubación de cultivos neuronales con aminoácidos excitatorios pueden originar la formación de las clásicas marañas neurofibrilares, asociadas a dicha patología (De Boni y Craper'85). Por otra parte, la localización de placas seniles y marañas neurofibrilares, que aparecen durante la enfermedad de Alzheimer se correlaciona perfectamente con la distribución de terminales glutamérgicas (Greenmyre y Young'89). Otro dato interesante, se refiere a que inyecciones de Glu o de sus derivados en la corteza cerebral inducen procesos de degeneración neuronal en el núcleo basal de Meynert, lugar en el que se originan las vías acetilcolinérgicas que proyectan a la corteza (Bartus y col'83).

Aun cuando existen datos contradictorios en la literatura, se han mostrado descensos significativos en los niveles de Glu tanto en corteza como en hipocampo de pacientes de Alzheimer (Hardy y col'87). Estos resultados se han confirmado cuando las muestras que se analizan son adquiridas de forma inmediata tras la muerte de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (Procter y col'88a). Igualmente, se han descrito disminuciones en el número de receptores glutamérgicos, particularmente del tipo NMDA en la corteza de estos enfermos (Chalmers y col'90). Estas pérdidas probablemente representen el correlato bioquímico del

daño de neuronas piramidales que ocurre durante la enfermedad de Alzheimer (Greemyre y Young'89).

Estos datos, que aisladamente pudieran no ser altamente significativos, en su conjunto y correlacionados, invitan a presumir que una degeneración de los sistemas glutamérgicos pudiera ser la responsable de la pérdida de memoria, así como de los síntomas de desconexión cortical propios de este grupo patológico.

Aún cuando, en el momento actual, postular que solo la neurotoxicidad glutamérgica sea el origen causal de los procesos neuropatológicos y conductuales de esta enfermedad no pasa de ser una especulación, los datos expuestos invitan a considerar seriamente el diseño de esquemas experimentales conducentes a aceptar o descartar tal hipótesis.

### **3.-LA CORTEZA FRONTAL DE RATA.**

#### **3.1.- FUNCIONES DE LA CORTEZA FRONTAL**

Como se ha venido apuntando la corteza del lobulo frontal es una de las zonas del cerebro más afectadas por el envejecimiento. De hecho, tanto los estudios anatomopatológicos como los bioquímicos llegan a resultados que indican la existencia en la zona de procesos degenerativos dependientes de la edad (Kemper'84). Por otro lado, el análisis de las funciones en las que se encuentra implicada esta parte de la corteza, permite apreciar que muchas de las deficiencias neurofisiológicas que se observan en sujetos dementes o muy viejos, obedecen a deterioros de tales funciones (Horvath y Davis'90).

En humanos la ablación de la zona conduce a pérdidas motoras que implican a músculos faciales y de los brazos así como a la realización de movimientos coordinados (Kuypers'81). También los sujetos con lesiones en la zona muestran alteraciones en aspectos tales como la fluidez verbal, el comportamiento social y afectivo, la espontaneidad y la

organización temporal y espacial (Blumer y Benson'75; Kolb y Taylor'81; Milner'64). En primates también se han observado deficiencias similares como consecuencia de lesiones en la zona (Petrides'82). En el caso de la rata se observa pérdida de los movimientos digitales de miembros anteriores y lengua, dificultad en la realización de tareas tales como la construcción de nidos, alteraciones del comportamiento social y afectivo además de pobre olfacción y dificultad en la orientación temporal y espacial (Kolb'84). Así pues, la comparación de los efectos de las lesiones de la corteza del lobulo frontal de ratas, monos y humanos, ha permitido conocer que los síntomas de la ablación cortical son marcadamente similares, incluso a pesar de las tremendas diferencias en el volumen relativo de la corteza en humanos versus otras especies, y particularmente roedores (Ver revisión de Kolb'84). Estudios llevados a cabo en roedores viejos mediante el uso de un laberinto de agua de Mori, indican que pueden presentar pérdidas de memoria edad-relacionadas como consecuencia de disfunciones del sistema colinérgico al igual que sucede en humanos, (Aggleton y col'89), mejorando su memoria si se les somete a un trasplante de células colinérgicas (Gage y Borklund'86).

Esta gran similitud, en cuanto a las funciones reguladas por la corteza del polo frontal entre diferentes especies, junto al conocimiento de que además de los seres humanos otros mamíferos como los roedores presentan alteraciones necrológicas a causa del envejecimiento (Oliver'81 ; Mikel y col'83; Luijtelaar y col'91; Gage y Borklund'86), hacen de la corteza del polo frontal de la rata un área que ha sido frecuentemente utilizado en los estudios sobre envejecimiento cerebral.

### 3.2.- CITOARQUITECTONÍA DEL LA CORTEZA FRONTAL DE LA RATA.

La corteza del polo frontal de la rata, incluye varias regiones citoarquitectónica y electrofisiologicamente diferentes, que dependiendo del autor y de los criterios utilizados, han recibido diferentes denominaciones. Para la realización de nuestro trabajo, hemos adoptado la clasificación propuesta por Zilles y Wree (1985).

La corteza cerebral de mamíferos, desde el punto de vista citoarquitectónico, se puede considerar dividida en dos grandes zonas; la **isocorteza** que presenta las típicas 6 capas corticales bien diferenciadas, y la **allocorteza** que muestra una organización laminar más heterogénea y en la que pueden faltar algunas de las capas. Evolutivamente las zonas de isocorteza corresponden al **neocortex**. Las de allocorteza corresponden, por una parte al **archicortex**, que tiene asignadas funciones límbicas, y por otra al **paleocortex**, que tiene asignadas funciones olfatorias.

La corteza del polo frontal de mamíferos presenta zonas allocorticales e isocorticales. Además, a diferencia de las regiones posteriores y temporales, es difícil de definir y delimitar por los impulsos predominantes que recibe desde los diferentes sistemas sensoriales. Esta última característica ha conducido a un profundo debate sobre las equivalencias existentes para este área entre distintas especies (Uylings y col'90).

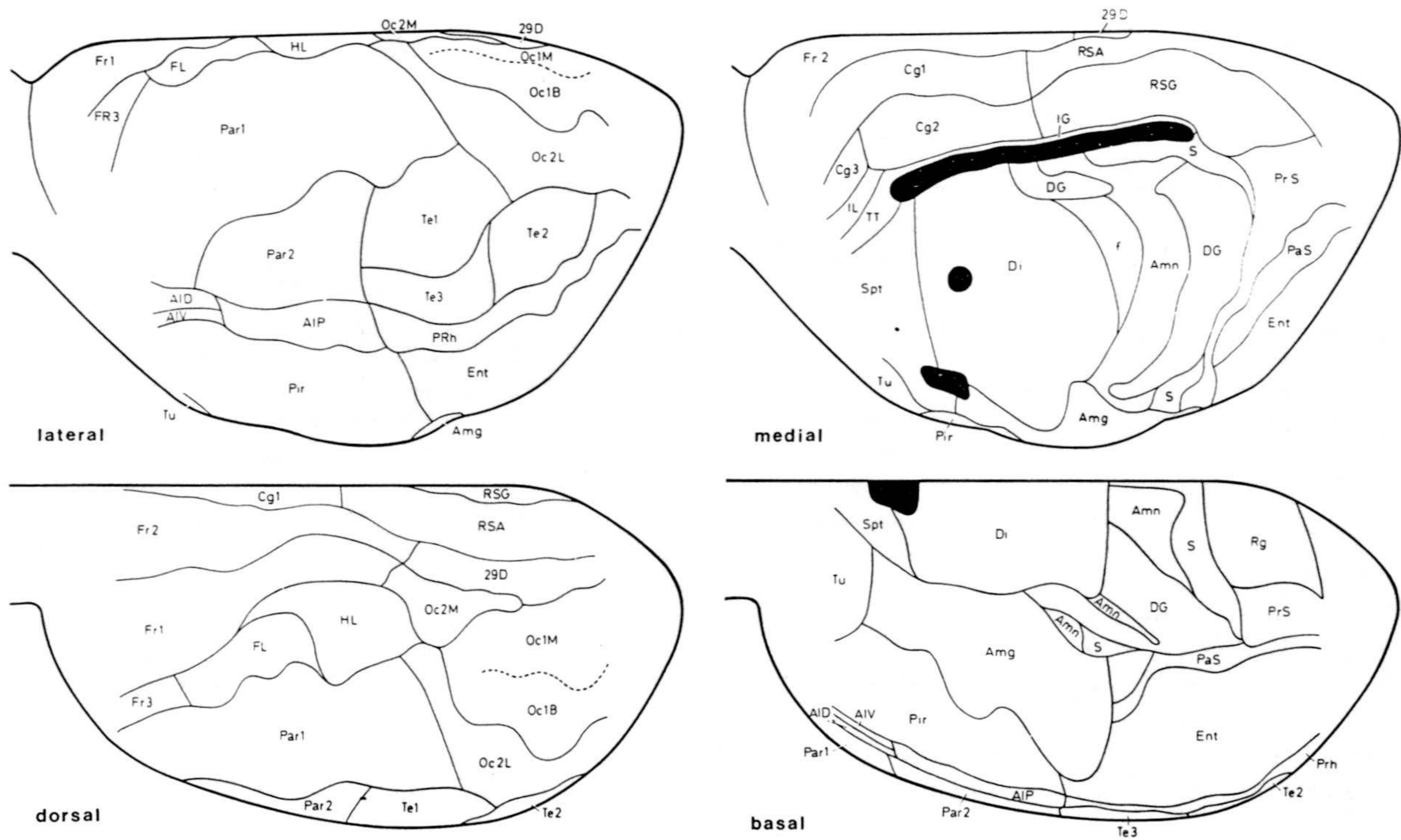
En mamíferos dicho lobulo, ha sido dividido históricamente en dos regiones. Una región **posterior** más o menos correspondiente al **giro precentral** de homínidos, que provoca movimientos cuando se estimula electricamente y fuertes deficit motores cuando se extrae; otra región más **rostral** que no provoca movimientos cuando se la estimula electricamente ni conduce a pérdidas motoras al extirparla (Kolb'84).

Esta fuerte división funcional, que fue inicialmente delineada en primates, se relaciona con la diferenciación anatómica propuesta por Brodmann (1909) para esta zona de la corteza. Así, dicho autor diferenció una zona **rostral** caracterizada por la presencia de una gruesa capa granulosa IV, y otra zona **posterior** caracterizada por no mostrar esta marcada capa granulosa. De esta forma, en primates y desde el punto de vista citoarquitectónico, se distinguen dos grandes áreas para la corteza frontal, la denominada **corteza granular** que se corresponde con la región rostral, y la **corteza agranular** que se corresponde con la zona posterior. A la corteza agranular también se la denomina como **prefrontal** y **premotora** para diferenciarla desde el punto de vista electrofisiológico de la corteza granular o **motora**.

No obstante, en otras especies evolutivamente inferiores a los primates, tal es el caso de animales lisencefalos como los roedores, la diferenciación propuesta en estas dos grandes zonas, tiene el problema de que en la región rostral no aparece la típica capa granulosa IV. Este hecho ha conducido a definir a esta región no por su citoarquitectonía sino por sus conexiones. Así, diferentes estudios llevados a cabo con técnicas de degeneración retrograda, han permitido identificarla de manera equivalente en diferentes especies de mamíferos, como el campo de proyecciones del núcleo mediodorsal del tálamo (MD) (Rose y Woolsey'48; Leonard'67). No obstante, y a pesar de que esta definición ha sido útil en los últimos 30 años, recientemente se han propuesto otras denominaciones, basadas en el empleo de nuevas técnicas electrofisiológicas y neuroanatómicas, que permiten una mejor correspondencia morfofuncional interespecífica (Uylings y col'90).

Estudios posteriores sobre el tema tratan de aunar información procedente de diferentes campos de la neurobiología tales como el citoarquitectónico, el electrofisiológico o el que abarca el tema de las conexiones con otras zonas cerebrales. Tal es el caso de los estudios llevados a cabo por Zilles y Wree (1985) mediante técnicas de cuantificación y análisis automático de imágenes. Los autores proponen un mapa completo de la corteza cerebral en el que la parte correspondiente a la corteza del polo frontal objeto de nuestro estudio, aparece dividida fundamentalmente en dos grandes áreas; la **corteza cingulada anterior** que podría

considerarse equivalente a la zona rostral, corteza prefrontal o premotora de primates, y la **región frontal** que se correspondería con la zona posterior o corteza motora. En relación al mapa de Zilles y Wree (1985) en nuestro estudio también se incluye una pequeña parte del sector denominado **FL**, que citoarquitectónicamente muestra caracteres muy diferentes a las dos grandes zonas anteriormente mencionadas. Esta zona que presenta propiedades de corteza motora y sensible (Hall y Lindohn'74) se encuentra en el límite entre la región frontal y **parietal**, siendo parte integrante de esta última.



**FIGURA 71.**-Mapa de ZILLES Y WREE (1985), en el que se pueden apreciar las diferentes zonas citoarquitectónicas del cerebro de la rata.



### 3.2.1.-Corteza cingulada anterior

La corteza cingulada anterior aparece dividida en cuatro sectores que son denominados como cingulado 1, 2 y 3 (Cg1-3) e infralímbico (IL). Estas zonas se identifican con la corteza prefrontal de homínidos, aunque citoarquitectonicamente, como ya hemos indicado, no presentan la típica capa granulosa IV que caracteriza esta misma área en los primates más evolucionados. La identificación de la corteza prefrontal en roedores fue realizada por Leonard (1969) mediante estudios de degeneración retrograda. Como ya se ha indicado fue catalogada, al igual que en otros mamíferos, como el campo de proyecciones del núcleo medio dorsal del tálamo (MD) (Leonard'69).

La extensión y conexiones de la corteza cingulada anterior de la rata ha sido estudiada mediante técnicas de marcaje (Ver revisión de Zilles y Wree'85).

Zilles y Wree'85	Krettek y Price '77	Vogt y Peters'81	Krieg'46	Leonard'67	Kolb'84	Zilles y col'80
Citoarquitect	Citoarquitect	Citoarquitect	Citoarquitect	Conexiones	Funcional	Citoarquitect
Cg1	Acd	24a	24	Campo de proyecciones del MD.	Medial frontal	C1
Cg2	Ac <sub>v</sub>	24b			C2	
Cg3	PL		32		Conocimiento y memoria.	C4
IL	IL		25		Tareas coord.	C3

**TABLA II.**-Equivalencias entre las denominaciones más comunes, asignadas a la corteza cingulada anterior (corteza prefrontal) de roedores, según diferentes criterios y autores.

En la tabla II, se indican las equivalencias entre las nomenclaturas empleadas por diferentes autores, y los criterios de clasificación empleados en cada caso.

Citoarquitectonicamente presenta capas internas más gruesas que las externas. Así las capas II-IV tienden a estar pobremente diferenciadas en comparación con estas mismas capas en las áreas isocorticales. Básicamente en todas las áreas existe una capa de grandes neuronas piramidales que está presente en todas las partes de la zona (Vogt' 87).

Muchos de los tipos neuronales presentes en la neocorteza están presentes también en la corteza cingulada anterior. Además de las típicas células piramidales invertidas aparece una amplia gama de células no piramidales entre las que aparecen tanto células multipolares, como bipolares. Aunque no aparecen las típicas 6 capas isocorticales, las células se organiza en láminas. Concretamente, como ya se ha indicado anteriormente, estas zonas no presenta capa IV de células granulares pequeñas. El área 24a (Acv, Cg2), presenta dos capas finas de grandes células que equivale a las capas II y V respectivamente. El área 24b (Acd, Cg1), tiene una nítida capa III, y las células de la capa V son más grandes que las del área 24b. Tanto en 24a como en 24 b la capa VI tiene neuronas más pequeñas que las de las demás capas (Vogt y Peters'81).

La corteza cingulada, es el mayor componente del sistema colinérgico, hecho que ha sido puesto de manifiesto mediante ensayos de la actividad colinesterasa (Lewis y Shute'67) y por técnicas de marcaje inmunocitoquímico para acetilcolinesterasa (AChE) (Johnston y col'81) y colin-acetiltransferasa (ChAT) (Houser y col'83).

Funcionalmente la ablación de la zona conduce a deficit en los procesos de conocimiento, incluyendo demora en la realización de tareas y alteraciones del comportamiento social y afectivo (Eichenbaun y col'83).

### *3.2.2. Región frontal*

La región frontal de la corteza en la rata corresponde a una región isocortical, que desde el punto de vista citoarquitectónico se encuentra dividida en 3 diferentes áreas denominadas como frontal 1-3 (Fr1-3). Estas áreas, están rodeadas por un lado de la corteza cingulada anterior; al otro lado limitan con la corteza insular agranular, de la que resultan difícilmente distinguibles.

La división de la región frontal en zonas, ha variado considerablemente en función de los diferentes estudios llevados a cabo. Así, Krieg (1946) indica que la zona se encuentra dividida en las áreas 4, 6, 8, 8a, 10 y 11. Zilles y col (1980) comparan las áreas de Krieg con las correspondientes regiones propuestas por Rose (1929) en sus estudios sobre otros roedores y lagomorphos, y por Brodmann (1909) y Von Economo y Koskinas (1925) en humanos, encontrando numerosas incongruencias; a raíz de estos estudios, Zilles y col'80 realizaron un primer mapeado de la zona, considerando una división situada en los niveles más mediales denominada como precentral medial (Prcm) y varias en los más laterales denominadas como precentral 1, 2 y 3 respectivamente (Prc1-3). Estas zonas, aunque están en consonancia con los estudios de microestimulación de Donoghue y Wise (1982) y Weisendanger (1982), fueron revisadas por Zilles y Wree (1985) con posterioridad, y sustituidas por la nomenclatura Fr1-3.

La razón fundamental que arguyen los autores para tal cambio, se basa en que en roedores no existe un surco central y por consiguiente tampoco se debería hablar de zonas precentrales. Las equivalencias entre ambas nomenclaturas serían como siguen: Fr2, corresponde con la zona Prcm de Krette y Price (1977a), con Prcm y Prc3 de Zilles y col (1980), con Prcm de Wisendanger y Wisendanger (1982) y la corteza anterior medial (Am) de Donoghue y Wise (1982). Fr1 y Fr3 corresponden a Prc1 de Krette y Price (1977a), con Prc1 y Prc2 de Zilles y col. (1980), con Prc de Wisendanger y Wisendanger (1982) y con la corteza lateral agranular (Ag<sub>l</sub>) de Donoghue y Wise (1982). La delimitación de Fr1 de Fr3 resulta más reciente, ya que solo es posible llevarla a cabo mediante medidas de densidad neuronal (Zilles y Wree'85).

Las conexiones de las áreas isocorticales de la rata ha sido estudiada por un gran número de investigadores (ver revisión de Zilles y Wree'85), existiendo unanimidad en que se trata de zonas que se corresponden con la corteza motora de la rata. Mediante estudios de microestimulación y conectividad se ha podido determinar que Fr1 y Fr3 corresponden a la corteza motora primaria de la rata también denominada como M1 (Zilles y Wree'85).

El patrón de laminación que presenta la región frontal se caracteriza, al igual que otras áreas isocorticales frontales, por ser de tipo agranular, es decir su capa IV granular no es prominente. De hecho, esta característica es el criterio de delimitación más importante para separar esta región de la parietal, en la que ya sí aparece una capa granular IV muy patente. Donoghue y Wise (1982) consideran las capas III y IV como una única capa; sin embargo, Zilles y Wree (1985) distinguen ambas capas apuntando que la capa IV presenta mayor densidad neuronal que la III. De hecho, la delineación de las zonas Fr1, Fr2 y Fr3, está basada en diferencias para los valores de densidad neuronal, en las diferentes láminas corticales de cada una de estas zonas. Así, Fr2 tiene mayor índice de densidad neuronal en las capas I-III que Fr1, pero menores valores en la capa IV. Las capas V y VI presentan valores más elevados para la densidad neuronal en Fr2 que en Fr1. Aunque Fr3 no presenta un claro patrón laminar que la diferencie de Fr1, sí se observa una elevada densidad neuronal en la capa IV en relación a Fr1. Esta mayor densidad neuronal en capa IV, no llega ni mucho menos, a alcanzar los valores que presenta esta capa en las zonas granulares de la región parietal (entre ellas el sector Fl incluido en nuestro estudio). El bajo índice de densidad neuronal en capa IV de Fr1 y Fr2, parece ser una característica de las áreas motoras agranulares en comparación a las áreas sensoriales primarias de la isocorteza de la rata.

Desde el punto de vista funcional una parte de Fr2 (la equivalente a Prcm) contiene la representación motora de los músculos de ojos y párpados, el resto (Prc3) se encarga de coordinación motora de lengua, labios y mandíbula; finalmente Fr1 y Fr3 (que equivalen a Prc1 y Prc2) coordinan miembros, vibras, tronco y zona rinal (Hall y Lindholm 1974).

### 3.2.3. Región parietal

En la corteza parietal Zilles y Wree (1985) distinguen cuatro áreas diferentes que denominan como área de los miembros anteriores (FL), área de los miembros posteriores (HL), parietal 1 (Par1) y parietal 2 (Par2). También, estas zonas han sido agrupadas en partes granulares y agranulares (Donoghue y Wise'82), en función de la mayor o menor densidad de pequeñas neuronas granulares presentes en la capa IV. Par1, FL y HL se corresponden electrofisiológicamente con SmI (corteza somatosensorial primaria) y par2, que es la zona de mayor extensión, con SmII (corteza somatosensorial secundaria) (Woosley y LeMessurier'48, Welker'76).

En nuestro estudio solo hemos incluido el sector Fl, que es la parte de la corteza que contiene la representación somatosensorial de los miembros anteriores (Hall y Lindholm '74) y que se considera incluida dentro de la parte granular, por lo que se delimita claramente de Fr1. En la primera delineación cortical de Zilles y col (1980), así como en la de Krette y Price (1977a), el sector FL fue considerado como parte de la corteza precentral (parte de Prcm y PrcL).

Zilles y Wree'85	Krettek y Price'77	Krieg'46	Kolb'83	Donowhue y Wise'82	Zilles y Col'80
Citoarquitect	Citoarquitect	Citoarquitect	Funcional	Electrofisiol	Citoarquitect
Fr2	Prcm	4	(Proy/ojos) Premotora	Am Anter. medial	Prcm, Prc3
Fr1	PrcL (Prc1)	6,8,8a, 10,11	Corteza motora primaria (M1)	Ag1 Fron. agranular	Prc1, Prc2
Fr3					
FL	Prc2, Prc3	3,1,2, 2a,14		Welker'76 Sm1 Somato sensorial 1	
Par1					

**TABLA 2I.**-Nomenclatura asignada a las diferentes partes de las regiones frontal y parietal según distintos criterios y autores.

En la tabla 2I se representa un cuadro indicativo de las denominaciones que han recibido estas zonas según diferentes criterios y autores.

## **4.-INTRODUCCION METODOLOGICA**

### **4.1.-TECNICAS MORFOMETRICAS Y DE ANÁLISIS DE IMAGEN.**

Los estudios cuantitativos sobre preparaciones histológicas son muy antiguos y se plantean inicialmente con la intención de comparar en situaciones diferentes el número de determinadas estructuras (por ejemplo células) o de las superficies ocupadas por ellas. En estos estudios realizados en cortes histológicos normales, semifinos o ultrafinos, los valores están limitados a la imagen bidimensional que ofrece la sección histológica. No obstante, muy pronto se plantea la necesidad de realizar calculos más exactos y ofrecer los datos no por unidad de superficie sino por unidad de volumen. Estos planteamientos suponen un gran empuje a este tipo de estudios que pasan a denominarse "morfométricos" y "estereología" a la ciencia que se ocupa de los mismos. Por esta razón Elias y col (1971) definen esta ciencia como la rama del saber que se ocupa de la "interpretación tridimensional de imágenes bidimensionales". Existe una serie de pioneros en este tipo de estudios (Agduhr'41; Floderus'44; Abercrombie'46) que aportan métodos para transformar el número de células contadas por unidad de superficie en número de células por unidad de volumen conociendo

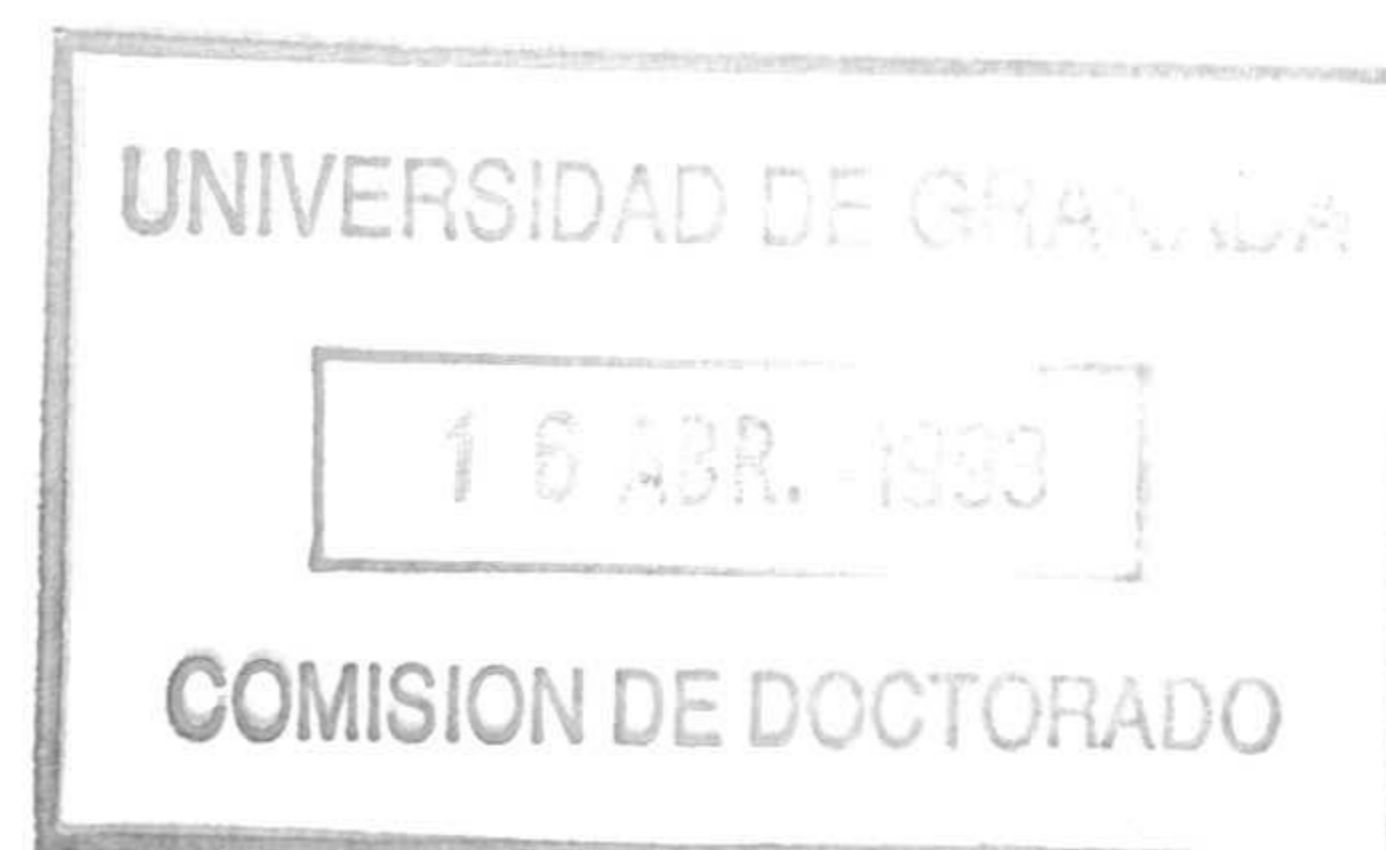
el espesor del corte y el diámetro celular o al menos el del núcleo. No obstante, el gran impulso a las técnicas estereológicas se debe a Weibel y colaboradores (Weibel'79; Weibel'80).

Los trabajos llevados a cabo en este campo, respecto al estudio del tejido nervioso, se han centrado fundamentalmente en la determinación del volumen ocupado por una determinada zona del encéfalo (núcleos cerebrales, zonas de corteza, etc.) normalmente con unos límites más o menos precisos, y en el contaje y valoración del tamaño de determinadas poblaciones de células nerviosas contenidas en tal estructura. Con este objetivo diferentes autores han venido utilizando desde muy antiguo las más variadas técnicas.

Desde que el geólogo francés Delesse (1848), se ocupó por primera vez del problema de la determinación del volumen de un cuerpo a partir de secciones del mismo, han sido numerosos los métodos desarrollados con esta finalidad, si bien el método de determinación volumétrica más exacto y a la vez más sencillo es el que se basa en la medición del contorno ofrecido por las secciones histológicas de la estructura que se desea valorar. De esta forma, conocidas las superficies ocupadas por las secciones histológicas de la estructura, basta con efectuar la suma de tales superficies y multiplicar por el grosor medio de los cortes para obtener su volumen. El método puede simplificarse bastante, ya que no es necesario valorar las superficies de todas las secciones obtenidas a lo largo de la mencionada estructura, sino que la determinación del volumen total se puede llevar a cabo a partir de una muestra de cortes elegidos periódicamente de la serie total (Konigsmark y col.'70).

Para determinar el valor de las superficies en sección de cualquier estructura se han utilizado diferentes métodos. Entre estos ha sido muy utilizado el método que combina el uso de microproyector y planímetro, que consiste proyectar las imágenes microscópicas de las secciones a aumentos conocidos y posteriormente medir planimétricamente su superficie (Navascués'78). La aparición de los analizadores de imágenes, en combinación con el desarrollo de la moderna tecnología en el campo de la computación y la inteligencia artificial, están permitiendo una revolución en este campo, al simplificar el trabajo derivado de estas mediciones.

La determinación del número de células nerviosas por unidad de volumen se ha abordado en diferentes partes del SNC, utilizando diversos métodos de recuento. No obstante, los métodos de recuento más exactos, son aquellos que se realizan directamente sobre la imagen debidamente aumentada que ofrece el corte histológico. Esta imagen puede obtenerse mediante microproyección (Bianchi'42; Escobar y col'68), en un monitor conectado al microscopio mediante una cámara de video (Terry y col'87; Henderson y col'80), o directamente en el propio microscopio ayudándose, en este último caso, de sistemas micrométrico-oculares para el recuento. Los métodos micrométrico-oculares han sido los más utilizados tradicionalmente por ser los más exactos. Fueron ya empleados por Hammarberg (1985) y su utilización continua en la actualidad. En este caso los recuentos se llevan a cabo



directamente mediante observación microscópica, con la ayuda de una retícula interpuesta en el ocular que acota el campo de observación. Se cuantifica el número de células que hay dentro de los límites de la retícula, previa determinación micrométrica de su superficie. Este método ha sido usado y descrito ampliamente (Konigsmark'70; Haug'72; O'Kusky y Colonnier'82; Vincent y Peters'89; Peters y col'91; Myers y col'92; Trillo y Gonzalo'92). Es un método muy exacto ya que a altos aumentos y dependiendo del grosor del corte, permite variar la profundidad de campo e identificar morfológicamente todas las células incluidas en la retícula.

Konigsmark (1970), estudió la eficacia de 4 métodos diferentes para calcular el número de neuronas presente en una determinada región cerebral. Esta valoración fue realizada comparando los resultados obtenidos para el recuento directo de la totalidad de células existentes en la población. Consideró como técnica de muestreo más exacta, aquella en la que, conocido previamente el volumen total (V), que ocupa la población objeto de estudio, se determina el número real de células (x) en una muestra de volumen conocido (v), tomado a partir de un conjunto de preparados elegidos de forma sistemática y periódica. El número total de neuronas (X) en la población fue estimado por estos autores como:  $X = V \cdot x/v$

Recientemente se vienen utilizando métodos de recuento automáticos, mediante el empleo de equipos digitales de análisis de imagen que avalúan niveles de gris y permiten diferenciar mediante técnicas densitométricas células de neuropilo. El problema de estos métodos automáticos, consiste en que solo permiten distinguir entre diferentes poblaciones de células nerviosa (neuronas, glia, pericitos y células de los vasos) en base su tamaño. No obstante, son muy útiles a la hora de llevar a cabo evaluaciones generales de la densidad y tamaño celular de forma rápida. Este tipo de técnicas han sido utilizadas por diferentes autores (Corsellis y col'75; Haug'84; Henderson y col'80; Zilles y Wree'85; Terry y col'87). El desarrollo de estos métodos, en los últimos tiempos, están permitiendo su utilización de forma interactiva, lo cual en gran medida elimina los problemas derivados del total automatismo comentados anteriormente. En la actualidad, estamos asistiendo a un desarrollo espectacular de estos métodos computarizados, ya que son capaces de analizar rápidamente una gran cantidad de información, por lo que están despertando de nuevo el interés de la comunidad científica por las técnicas cuantitativas en el campo de la neurobiología en general y del envejecimiento en particular. No obstante, todavía son pocos los laboratorios que cuentan con este tipo de medios debido a su alto coste y necesidad de personal especializado.

En cualquier caso, y sea cual sea el método elegido, para llevar a cabo estudios de cuantificación en términos absolutos se requieren una serie de precauciones que aseguren la obtención de resultados fiables y reproducibles. En este sentido, se han de considerar las siguientes:

- Retracciones tisulares producidas por causa de la fijación e inclusión. De hecho todas las técnicas que conducen a la obtención de preparaciones histológicas producen

retracciones en el tejido; por ello, cuando se trata de dar valores absolutos, es necesaria la aplicación de formulas correctoras en función del grado de retracción sufrido por el tejido (Haug'84). Un método que permite corregir las retracciones consiste en medir la superficie de las secciones antes y después de aplicar las técnicas histológicas y calcular de esta forma el % de retracción habido. Por este método, O'Kusky y Colonnier (1982) encuentran, para secciones de cerebro fijadas con aldehidos e incluidas en resinas epoxi que la retracción alcanza valores lineales del 16% que suponiendo sean homogéneas en las tres direcciones del espacio implican aproximadamente un 42% para superficies y un 69% para volúmenes.

-Grosor de los cortes, para evitar que la misma estructura sea contada en dos cortes sucesivos. Con este objetivo, se han venido aplicando una serie de formulas que permiten corregir los errores debidos a este extremo (Floderus'44; Abercrombie'46). La más simple de estas formulas corresponde a la de Abercrombie que corresponde a la expresión.

$$N=n.Gm/Dm+Gm$$

Donde, "N" es el número de núcleos completos presentes en la sección, "n" el número de núcleos y fragmentos nucleares presentes en la sección, "Gm" el grosor medio de las secciones y "Dm" el diámetro medio de los núcleos del elemento celular que se está contando. Este tipo de formulas se hacen necesarias sobre todo cuando se trata de secciones de grosor inferior a los elementos o estructuras que se cuentan. Tal es el caso de los cortes semifinos y ultrafinos en los que se efectúan sobrestimaciones del número de células que pueden alcanzar valores bastante elevados (O'Kusky y Colonnier'82).

-Tipo de muestreo, de forma que sea representativo de la población que se desea evaluar. Haug y col (1971), describen en corteza un método de muestreo sistemático consistente en efectuar los recuentos en columnas verticales de corteza cerebral barriendo toda la zona, desde la superficie pial hasta la sustancia blanca. Recientemente diferentes autores (Vincent y col'89; Peters y col'91) han utilizado este método, ya que resulta sumamente útil sobre todo cuando los recuentos (tal es el caso de los autores citados) son efectuados sobre cortes semifinos que no permiten una clara identificación de las diferentes capas corticales.

-Elemento diferenciador elegido en los recuentos; se puede emplear el soma (Escobar y col'68; Terry y col'87), el núcleo (Abercrombie'46; O'Kusky y Colonnier'82; Vincent y col'89; Peters y col'91) o en el caso de las neuronas el nucléolo (Konigsmark'70; Chow y col'66; Haug'72). Evidentemente habrá que elegir como elemento diferenciador el más adecuado a la estructura que se desee contar y a la técnica utilizada en la preparación del tejido.



#### 4.4.-TECNICAS DE TINCION

El violeta de cresilo es un colorante básico con gran afinidad por el ARN, por lo que tiñe de color azul intenso el nucléolo y los ribosomas adosados a las cisternas del retículo endoplasmático que forman los característicos grumos de Nills en las neuronas; también tiñe, menos intensamente los cromocentros que abundan frecuentemente en los núcleos de los diferentes tipos de células gliales. Estas peculiaridades del colorante, en cuanto a la demostración de las características citológicas de las células nerviosas (Rios y col'77) hacen que sea particularmente útil en los estudios citomorfométricos y cuantitativos del sistema nervioso (Navascués'78; Zilles y Wree'85; Haug'84; Terry y col'87).

La GFAP (proteína fibrilar ácida) es el constituyente fundamental de los gliofilamentos del citoesqueleto de los astrocitos fibrosos y protoplasmáticos del SNC; por esta razón ha sido utilizada en más de 500 publicaciones como la marca más usada en los estudios sobre estas células. Bien es cierto por otra parte, que también otros tipos celulares, como ya se vio en el apartado correspondiente de la introducción, pueden expresar esta proteína (Jacque'91). La GFAP se localiza en el soma de la célula astrogial pero generalmente es más abundante en las prolongaciones, particularmente en los pies de los astrocitos, tanto en los que se apoyan sobre los capilares y vasos sanguíneos como los que forman el borde glial limitante de la piamadre. (Jacque'91).

#### 4.3.-ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

La existencia de aminoácidos libres en muestras biológicas plantea el problema de su cuantificación y determinación. Los métodos utilizados, fueron inicialmente electroforéticos (Headcote y Davies'71), sin embargo hoy día las técnicas cromatográficas han tenido un mayor éxito y desarrollo (Gunawan y col'90).

Junto al empleo de métodos cualitativos para determinar aminoácidos, como podrían ser la cromatografía en papel (McEvoy'66) o en capa fina (Jorgensen'70), el gran avance de las técnicas cuantitativas, ha revolucionado sin duda el análisis de determinados compuestos.

En este sentido y a pesar de que en la década de los 70, la cromatografía de intercambio iónico "autoanalizador" fué la más popular (Moller'75), la búsqueda de métodos analíticos menos costosos y más rápidos, dio origen al desarrollo de la cromatografía de gases (Wolfensberger y col'82). Finalmente el perfeccionamiento técnico de la cromatografía líquida durante los últimos diez años, ha hecho de esta técnica la más codiciada para el análisis cuantitativo de numerosos compuestos, y entre ellos los aminoácidos (Haginaka y Wakai'90).

#### *4.3.1.-Cromatografía líquida de alta presión*

El reciente desarrollo de la cromatografía líquida ha sido aplicado con éxito al análisis de aminoácidos en diferentes tipos de muestras biológicas incluyendo tejido cerebral (Gunawan y col'90) y perfundidos cerebrales (Peinado y col'86). Existen distintas metodologías para el análisis de aminoácidos por cromatografía líquida. Entre las más populares se sitúa la formación de FMOC-derivados (cloruro de 9,fluorometil-oxycarbonilo) (Einarson'85), PICT-derivados (feniltioisocianato) (Gunawan y col'90) y OPA-derivados (o-ftaldehido) (Haginaka y Wakai'90). Estos tratamientos pueden ser previos (precolumna) o posteriores (postcolumna) a la separación de los componentes de la mezcla.

De los dos tratamientos, el postcolumna es menos sensible. Ello es debido, a la dilución, que sufre el eluente por parte del reactivo de derivación, al salir de la columna. Sin embargo la derivación postcolumna permite un mayor control sobre la temperatura de reacción y hace innecesaria que la reacción afecte a todos los aminoácidos presentes en la muestra. Por otra parte la estabilidad de los derivados en el tratamiento postcolumna no es un problema significativo dada la immediatez entre la reacción y la detección (Haginaka y Wakai'90). La cromatografía líquida permite sensibilidades del orden de los femtomoles para pequeños volúmenes de muestra y presenta tiempos de análisis considerablemente cortos (10-15 min.) (Ogden y Foldi'87).

El feniltioisocianato (PICT) es el denominado reactivo de Edman y ha sido muy utilizado en secuenciación de péptidos y proteínas (Edman y Henschen'75). Los aminoácidos primarios y secundarios reaccionan con él a un pH alcalino dando feniltiocarbamil aminoácido-derivados que absorben en el ultravioleta a 245 nanómetros y no son fluorescentes (Gunawan y col'90). La continuación de la reacción, hasta la formación de feniltiohidantoinas ha sido también utilizada (Simmaco y col'85). El proceso de derivación es largo y laborioso, incluyendo varios pasos de secado al vacío y la adición en los estadios intermedios de distintos reactivos. En consecuencia este tipo de derivados puede emplearse exclusivamente en derivación precolumna (Gunawan y col'90). Es un método menos sensible que OPA y FMOC. (Ogden y Foldi'87).

El cloruro de 9,fluorometiloxycarbonilo (FMOC) es un reactivo relativamente reciente que ha tenido un impacto significativo, no solo en su utilización para la síntesis de péptidos como protector de grupos amino sino además en el análisis de aminoácidos (Ogden y Foldi'87). Reacciona con aminas primarias y secundaria dando un compuesto fluorescente de alta estabilidad, superior a las 30 horas (Schneider y col'86). Presenta sin embargo el inconveniente de que el espectro de fluorescencia del FMOC está muy cercano al del producto de reacción, apareciendo amplios picos en el cromatograma que interfieren con los correspondientes a los aminoácidos. Para evitar esto el exceso de FMOC que queda tras la reacción y sus productos de hidrólisis deben ser eliminados antes de la separación cromatográfica. Por esta razón no se utilizan en derivados postcolumna (Ogden y Foldi'87).

El O-ftalaldehido (OPA) reacciona con los aminoácidos a un pH alcalino (9.5), junto a un tiol como molécula auxiliar, rindiendo 1-(5-alkil)-2-alkil-isoindoles, un producto fluorescente e inestable (Cooper y col'84).

El tiempo de reacción es corto y el derivado presenta una alta fluorescencia con lo cual se puede conseguir una alta sensibilidad (Haginaka y Wakai'90). Las aminas secundarias (prolina e hidroxiprolina) no reaccionan con el OPA, siendo necesario para determinarlas su oxidación previa (Bohlen y Mellet'79). Esta limitación es compartida con la ninhidrina y la fluoresceamina, dos reactivos de aminoácidos muy populares. La detección suele realizarse con una excitación próxima a los 340 nanómetros y una emisión cercana a los 460 nanómetros (Haginaka y Wakai'90).

El tiol elegido como molécula auxiliar influye decisivamente no solo en la producción de fluorescencia sino también en la estabilidad de los derivados (Haginaka y Wakai'90). Los tioles más frecuentes empleados han sido: 2,mercaptoetanol es volátil y altamente tóxico, el mercaptopropiónico que no es volátil, lo que puede suponer una ventaja para su uso (Ogden y Foldi'87), el tert-butiltiol que confiere una mayor estabilidad a los derivados, particularmente cuando se trata de aminoácidos con función neurotransmisora (Allison y Shoup'84).

Los derivados OPA también absorben en el ultravioleta, utilizándose este tipo de detección cuando no es necesaria una alta sensibilidad (rango de picomoles). Presentan dos máximos de absorción. La detección a 230 nanómetros es más sensible, sin embargo las impurezas pueden causar problemas de interferencia y modificación de la línea base. Se recomienda por tanto la detección con longitud de onda a 330 nanómetros (Ogden y Foldi'87).

Recientemente se ha descrito que los aminoácidos OPA-derivados pueden sufrir oxidación anódica a un potencial moderado permitiendo el uso de detectores electroquímicos (Donzanti y Yamamoto'88). Esta metodología ha sido ampliamente desarrollada al permitir el análisis de pequeños volúmenes de muestra con baja concentración (Peinado y col'86).

La formación de OPA-derivados se ha utilizado tanto en derivación precolumna como postcolumna (Ogden y Foldi'87).

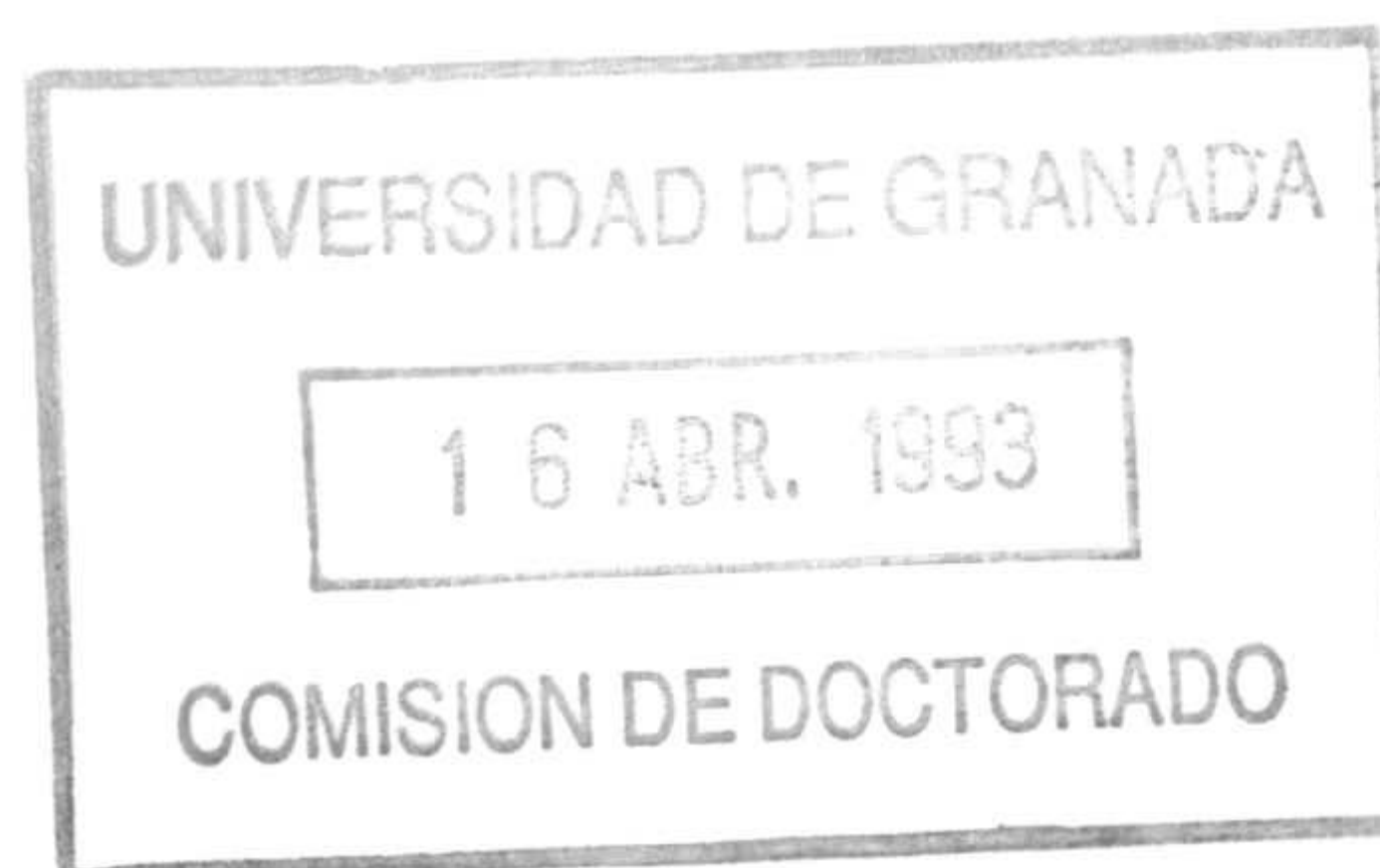


**HIPOTESIS Y  
PLANTEAMIENTO**

En la actualidad y en las sociedades occidentales, la población de edades superiores a 85 años es el segmento de más rápido crecimiento en términos de porcentaje. Este incremento en el envejecimiento de la población condiciona la aparición de una extensa patología geriátrica, entre la que destaca la demencia. De hecho, la incidencia de la demencia senil, se incrementa desde el 1% en edades de 60-65 años, a valores cercanos al 3% en edades de 80-85 años. De éstas, más de un tercio son de tipo Alzheimer. Se ha sugerido que a edades de 90-95 años un tercio de la población padecería la enfermedad de Alzheimer (Katzman'88). Este progresivo aumento de la tasa de demencias, paralelo al incremento en la edad, cuestiona si la demencia es de hecho una forma acelerada de envejecimiento cerebral.

Esfuerzos investigadores recientes han aportado un gran avance en nuestro entendimiento de las causas anatómicas, neurofisiológicas, neuroquímicas y genéticas de la enfermedad de Alzheimer y otros tipos de demencia. (Selkoe'91). Estos datos contrastan con el escaso conocimiento que poseemos de los cambios que ocurren durante el envejecimiento normal. (Cotman y Peterson'89).

Aún cuando los datos son controvertidos, se han descrito diversas alteraciones neuromorfológicas y neuroquímicas durante el envejecimiento del cerebro. Existe, sin embargo, una gran heterogeneidad no solo en el desarrollo del proceso, sino también en cuanto a la selectividad de las regiones cerebrales implicadas o especies y modelos empleados. Los cambios estructurales incluirían entre otros, pérdida neuronal, incremento de células gliales



y aparición de placas neuríticas (depósitos de beta-amiloide) y marañas neurofibrilares. (Man y col'86; Cotman y Peterson'89). Los cambios neuroquímicos aparecerían tanto en relación al metabolismo energético, (Borowsky '89) como afectando también a diferentes neurotransmisores (Decker'87; Morgan'87; Carlson'85) y sus correspondientes sistemas enzimáticos (McGeer y McGeer'89a). Entre aquellos, los aminoácidos ácidos, glutámico y aspártico, ha recibido una gran atención durante los últimos años (Mora'88), no solo por su amplia distribución, sino por su potente capacidad neurotóxica (Dichter y Choi'89).

Esto ha llevado a plantear la posible hiperactividad glutamérgica como causa de la neurodegeneración, pérdida neuronal y gliosis subyacente a los procesos de envejecimiento (Maragos y col'87; Dicher y Choi'89). Esta autodegeneración de neuronas glutamérgicas conduciría en última instancia, a un descenso de los niveles del neurotransmisor (Maragos y Col'87; Peinado y col'91). Debemos considerar, no obstante, que los aminoácidos ácidos, proceden no solo del "pool" neurotransmisor, sino también el "pool" metabólico. Este puede ser modificable en base a la actividad de toda una serie de enzimas proteolíticas como las aminopeptidasas, capaces de romper entre otros glutámico y aspártico N-terminales (Kelly y col'78; Iribar y col'84).

Finalmente es de destacar que muchas de estas alteraciones neuromorfológicas y neuroquímicas edad relacionadas se localizan en la corteza frontal, apareciendo precisamente exacerbadas en la demencia de tipo Alzheimer (David y Wolozin'89).

Así pues, el presente estudio pretende analizar de forma paralela los efectos del envejecimiento (ratas de 3-6 meses vs 30-36 meses de edad), no solo sobre determinados parámetros estructurales de las poblaciones neuronal y glial de la corteza frontal, sino también posibles alteraciones neuroquímicas. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- Primero: Determinación de las variaciones citoarquitectónicas neuronales y gliales edad relacionadas en la corteza frontal de la rata, analizando cuál es la contribución específica de las diferentes capas corticales. Los parámetros a determinar han sido: 1) Valoración del volumen total de la zona estudiada y el de las capas corticales I, II-IV, V y VI; 2) Determinación de la densidad neuronal en cada una de las 4 capas corticales consideradas y en la totalidad de la corteza; 3) Determinación de la densidad neuroglial en cada una de las 4 capas corticales consideradas y en la totalidad de la corteza y 4) Determinación de la superficie media de los somas y núcleos neuronales en las 4 capas corticales consideradas y en la totalidad de la corteza.



- Segundo: Determinación de las variaciones edad relacionadas sobre la densidad de astrocitos marcados con anti-GFAP y del número total de los mismos en las capas externa, media e interna, así como en la totalidad de la corteza frontal.
- Tercero: Determinación de niveles endógenos de los aminoácidos ácido glutámico, ácido aspártico, GABA, taurina, glutamina y serina, en homogenizados de corteza frontal de cerebros jóvenes y viejos.
- Cuarto: Estudio de las posibles diferencias, edad relacionada con la actividad glutamílica, piroglutamílica, aspártica y alanil-aminopeptidásica en las mismas áreas corticales y animales del punto anterior.



# **MATERIAL Y METODOS**

## **1.-ANALISIS DE PARAMETROS MORFOLOGICOS**

### **1.1.- ANIMALES.**

Como material para la realización de los estudios morfométricos se han utilizado ratas macho de la raza Wistar. Para los estudios efectuados sobre cortes incluidos en parafina y teñidos con cresil-violeta, se dispuso de un grupo de 10 individuos divididos en dos lotes de 5 cada uno; el primer lote con edades comprendidas entre 4-6 meses y un peso corporal de 34413gr., y el segundo, integrado por individuos de 32-36 meses de edad y un peso corporal de 48441gr. En el caso de los estudios efectuados sobre cortes inmunoteñidos con antiGFAP, se utilizaron 6 individuos, de los cuales 3 eran jóvenes con edades comprendidas entre 3-4 meses y un peso corporal 3048gr., y los otros 3 viejos con una edad de 30 meses y peso corporal 49023gr.

Todos los animales fueron criados bajo condiciones controladas de fotoperiodo día/noche de 12h y alimentación y agua "ad libitum" en la unidad de envejecimiento del estabulario de la Universidad de Granada.

## 1.2.-TECNICAS DE PREPARACIÓN DEL TEJIDO.

Los animales fueron previamente anestesiados con equitensina e inyectados intracardiamente con 0,2 ml de heparina para facilitar la perfusión y evitar la formación de coágulos. Al objeto de eliminar la sangre y evitar posibles cambios postmortem, todos los animales se perfundieron a través de la aorta con una solución lavadora a pH y osmolaridad fisiológicos, burbujeada con carbógeno (95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente se continuó con la solución fijadora adecuada a cada una de las técnicas empleadas (cresil-violeta o antiGFAP).

### 1.2.1.-Técnica del Cresil-violeta.

Como solución fijadora fue empleado liquido de carnoy perfundiendo unos 300 ml. durante unos 20 min. Tras la extracción del cerebro, este permaneció durante 48h a temperatura ambiente, en la misma solución fijadora.

Completado el proceso de fijación, se procedió a realizar la inclusión de la zona objeto de estudio en parafina. Con esta finalidad se completó la deshidratación del tejido con un primer paso por una solución saturada de CO<sub>3</sub>Ca en etanol absoluto, al objeto de neutralizar la acidez producida por el ácido acético del fijador. Tras aclarado en metil-benzoato, e inmersión en benzeno como liquido intermediario, se llevó a cabo la inclusión en parafina. Formado el correspondiente bloque se obtuvieron cortes transversales seriados de 10µm de grosor con un microtomo de parafina Leitz tipo Minot.

La zona estudiada comprendió aproximadamente un total 230 cortes por individuo de los cuales se seleccionó uno de cada diez para llevar a cabo los correspondientes estudios cuantitativos.

Los cortes seleccionados fueron desparafinados con xilol, hidratados con etanol de graduación decreciente, teñidos durante 5min con violeta de cresilo, deshidratados en etanol de graduación creciente, aclarados con xilol y finalmente montados en eukitt.

Con esta técnica de tinción se han evaluado los parámetros morfométricos volumen cortical, densidades neuronales y gliales y superficie del soma y núcleo neuronal. Las determinaciones se han efectuado sobre muestras extraídas de ambos hemisferios excepto para el caso del volumen cortical que solo fue evaluado en el hemisferio derecho.



*FIGURA 1M.-Sección de corteza cerebral a nivel del polo frontal (corteza zingulada anterior) teñida con cresil violeta. Obsérvense las diferentes capas corticales.*

### *1.2.2.-Técnica de marcaje de GFAP.*

Tras la perfusión de la solución lavadora, se continuó con 300 ml de solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS (pH=7.4 y 0.1M) durante 20min. Una vez extraído el cerebro se completó su fijación por inmersión en la misma solución fijadora durante 3h a temperatura ambiente. A continuación se introdujo en una solución crioprotectora (sacarosa al 30% en PBS) durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente se obtuvieron cortes transversales seriados de 30 $\mu$ m de grosor de toda la región del polo frontal, con un criostato Cryocut 2000 Reichert Yung. El total de cortes obtenidos varió entre 82 y 84 según el individuo estudiado, si bien de cara a los estudios cuantitativos se tomó uno de cada cinco, por lo que el número total de cortes incluidos en el estudio fue entre 16-17.

Los cortes se recogieron en PBS y antes de someterlos a incubación con el anticuerpo primario (anti-GFAP) fueron lavados en PBS enfriado a 4°C durante 15 min para eliminar los restos de fijador. A continuación se procedió a bloquear la actividad peroxidasa endógena con una solución al 1,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS durante 30 min, para continuar con dos lavados de 15min en NGS (suero normal de cabra) al 3% en PBS y el segundo PBS-Triton X-100 al 0,2%. El objeto de este último baño fue doble. El NGS, inactiva posibles grupos reactivos indeseables que pudieran interferir con los anticuerpos utilizados en la técnica, y por otro lado, el Tritón X-100, hace permeable la membrana del astrocito, para permitir la entrada al citosol (lugar de localización de la proteína citoesquelética GFAP) del anticuerpo primario y demás moléculas utilizadas en la técnica. Todos estos lavados se llevaron a cabo a 4°C.

El anticuerpo primario, un monoclonal anti-GFAP obtenido en rata y tipo inmunglobulina G (IgG), fue utilizado a una dilución 1:200 en PBS-Triton X-100 y NGS al 1%. La incubación de los cortes en el anticuerpo primario se efectuó durante toda la noche en agitación a 4°C. Tras dos lavados sucesivos en PBS de 15' cada uno, para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se procedió a incubar los cortes con un anticuerpo secundario biotinizado obtenido en cabra y dirigido contra el sector FC de la IgG de rata, durante 1h. De nuevo, los cortes fueron lavados durante 15' dos veces sucesivas en PBS y se pasaron a incubar 1h con el complejo ABC. También en este caso todos los pasos fueron efectuados a 4°C.

El complejo ABC, corresponde a un reactivo constituido a base de avidina y peroxidasa de rábano biotinizada. La avidina presenta una alta afinidad por la biotina (millones de veces mayor que la de cualquier anticuerpo por su antígeno), siendo además su unión irreversible.

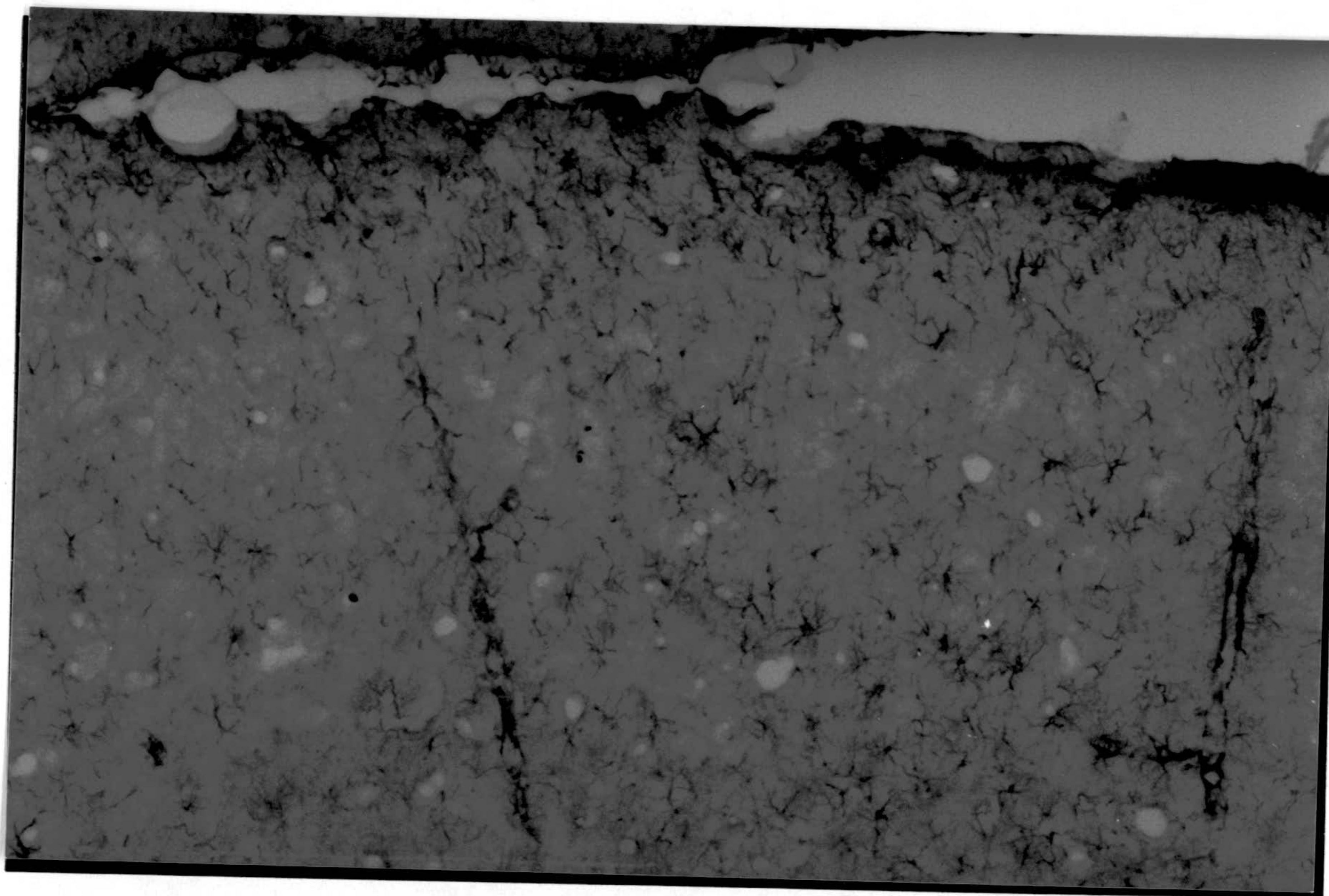
La avidina posee cuatro sitios de unión para la biotina. La biotina presenta capacidad para conjugarse con muchos tipos de proteínas, incluidas enzimas; estas últimas pueden unir varias moléculas de biotina. Estas propiedades de ambas moléculas permiten formar complejos, tales como el ABC, entre avidina y encimas biotinizadas (Hsu y col'78).

Aunque la estructura del complejo no está aún bien definida químicamente, las evidencias existentes sugieren que está constituido por muchas moléculas de peroxidasa de rábano biotinizadas unidas a avidina, constituyendo un complejo de organización tridimensional.

La formación del complejo se lleva a cabo por unión de la avidina a la peroxidasa de rábano biotinizada en solución y a concentración óptima. Después de la incubación inicial, parecen existir pocos cambios en el complejo, como demuestra su sensibilidad a la inmunotinción con peroxidasa, lo cual permite su uso, incluso después de 72 h. de su preparación. De esta forma, cuando los cortes son incubados con una solución del complejo ABC, este se une a la biotina del anticuerpo secundario.

El anticuerpo secundario y el complejo ABC corresponden al kit ABC de Vectastain (Vector) y fueron utilizados diluidos en PBS según recomendaciones incluidas por la casa comercial en el citado kit.

Un nuevo lavado con PBS durante 15min precedió al revelado de la peroxidasa con diaminobencidina (DAB) diluida en PBS y  $H_2O_2$  (5mg de DAB en 10 ml de PBS y  $30\mu l$  de  $H_2O_2$  al 0.3%). El tiempo de revelado fue controlado bajo inspección microscópica. Finalmente los cortes fueron contrateñidos durante 1min con hematoxilina Hansen, deshidratados, aclarados y montados con eukit.



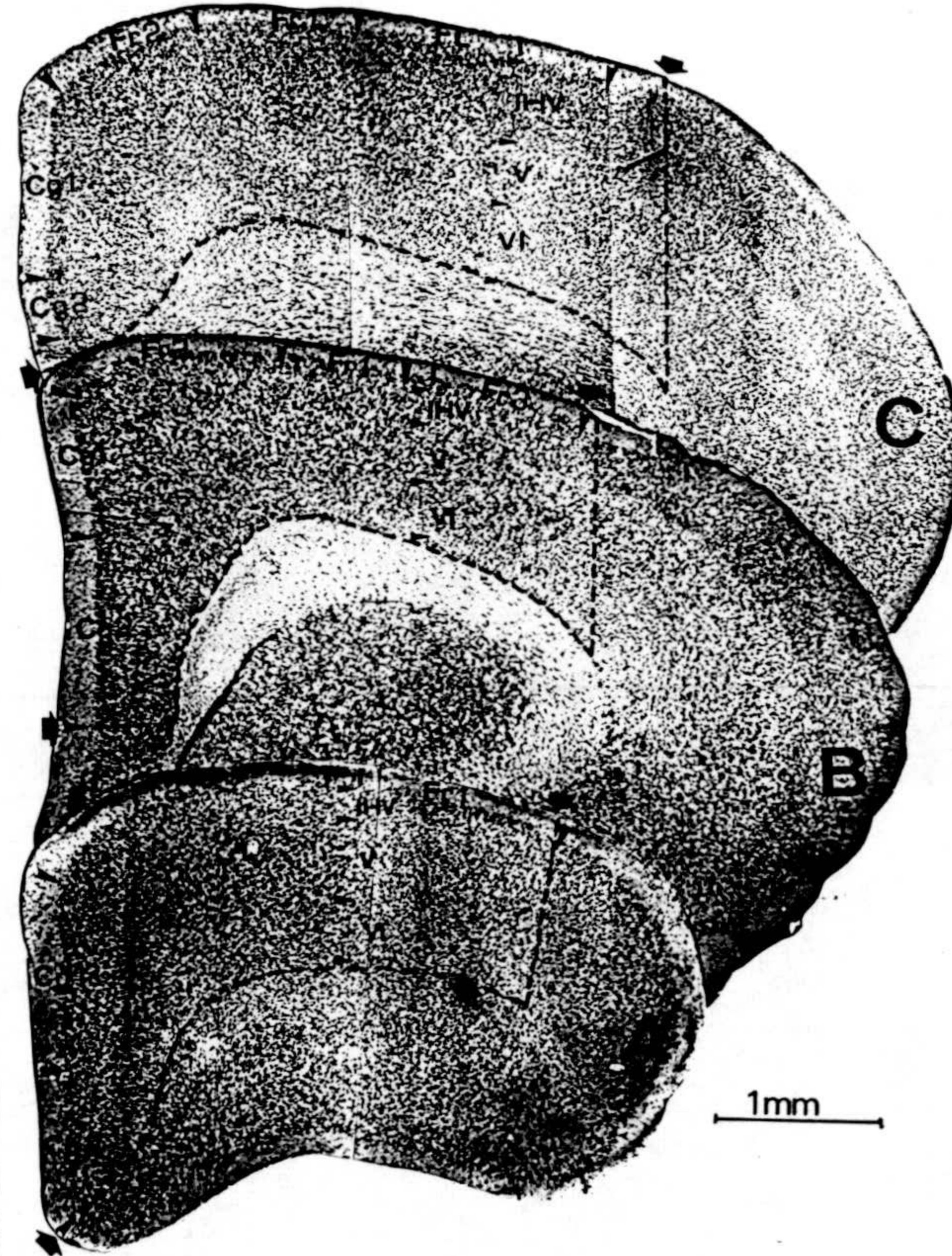
*FIGURA 2M.-Astrocitos localizados en diferentes niveles corticales, inmunoteñidos con anti-GFAP.*

Las secciones histológicas obtenidas con esta técnica han servido para llevar a cabo la determinación de la densidad astrocitaria.



### 1.3.-DELIMITACIÓN DE LA ZONA OBJETO DE ESTUDIO

Los límites precisos de la zona estudiada han sido fijados por criterios anatómicos. Concretamente la delimitación en el sentido mediolateral, se ha establecido para ambos hemisferios como la zona comprendida medialmente entre la región interhemisférica y lateralmente por una línea trazada de forma tangente a la situación del cuerpo calloso perpendicular a la superficie pial. En el sentido anteroposterior los límites han sido fijados desde la zona en que los lóbulos olfatorios se unen con la corteza orbital (Bregma 4.7mm; Interaural 13.7mm) hasta la zona en que ambos hemisferios aparecen totalmente unidos en la zona ventral por debajo de cuerpo calloso (Bregma 0.7mm; Interaural 9.7mm) (Coordenadas tomadas de Paxinos y Watson'82).

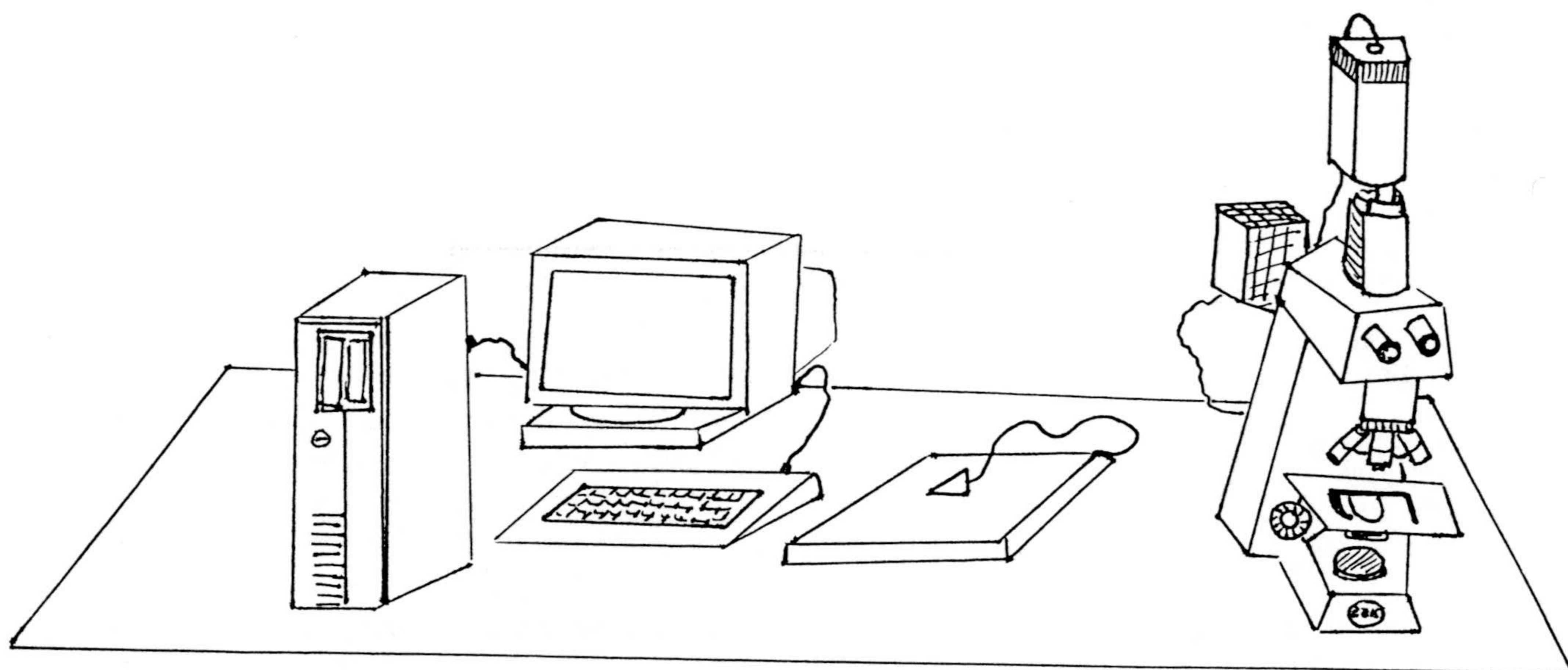


*Figura 3M.-Reconstrucción fotográfica en la que se observa a tres niveles diferentes (anterior, medio y posterior) la zona frontal estudiada.*

Todos los estudios han sido efectuados considerando las seis capas corticales existentes a estos niveles, agrupadas en cuatro (I, II-IV, V y VI).

#### 1.4.-TECNICAS MORFOMETRICAS Y DE ANÁLISIS DE IMÁGEN.

Las determinaciones morfométricas fueron realizadas con la ayuda del equipo de análisis de imagen Videoplan de Kontron, conectado a un microscopio Zeiss modelo Axioscop. Este equipo incluye una cámara de video instalada sobre el microscopio, un monitor de televisión, un tablero digital con lápiz (ratón), y finalmente un computador tipo PC 4.86 con 1Mg de memoria RAM, microprocesador matemático y tarjeta de caracteres gráficos (hardware). En el computador se encuentra instalada la aplicación informática de análisis morfométrico "Video" (software).



*FIGURA 4M.-Dibujo esquemático del equipo Videoplan de Kontron con el que fueron realizadas las determinaciones morfométricas*

El sistema opera mediante el envío de la imagen microscópica a través de la cámara de video hasta el monitor. El monitor registra dicha imagen, la cual aparece en pantalla. A través del tablero digital y mediante el uso del lápiz, el operador, puede interactuar con la imagen microscópica de cualquier estructura seleccionada, mediante trazado de sus contornos o punteado de incidencias que se deseen contar. En todo momento, tanto las líneas trazadas como los puntos señalados aparecen en pantalla superpuestos a la imagen de la estructura. Concluida la operación, la información de la estructura suministrada por el operador a través del tablero digital, es enviada a la computadora en donde es procesada, analizada y almacenada por la aplicación informática en forma de valores. Diferentes parámetros morfométricos de la estructura previamente seleccionados, pueden ser obtenidos en cada caso. El calibrado previo del sistema, permite la obtención de medidas reales de la estructura en las unidades seleccionadas.

### *1.4.1.-Determinación del volumen cortical*

Las valoraciones volumétricas de las diferentes capas corticales fueron realizadas exclusivamente en las secciones de cerebro teñidas con la técnica del cresil violeta ya que los tratados con anti-GFAP no permiten identificar con claridad las diferentes capas corticales. De esta forma, una vez delimitada la zona de estudio se procedió a evaluar su volumen, considerando independientemente las capas I, II-IV, V y VI. Los motivos que nos han llevado a agrupar las capas II-IV en una sola, se ha debido a la dificultad, dado su escaso grosor, de distinguir claramente unas de otras.

De acuerdo con Konigsmark (1970), para el cálculo del volumen de una determinada estructura no es necesario valorar la superficie de todas sus secciones histológicas; solo calculando las superficies en cortes elegidos periódicamente a partir del total, y extrapolando los valores resultantes a los restantes cortes no medidos, se puede determinar el volumen de la estructura con un error mínimo. Esta forma de proceder, que hace menos laboriosos los procedimientos de determinación volumétrica, ha sido precisamente la aplicada para la realización de nuestro estudio, habiendo elegido 1 corte de cada 10.

La expresión que calcula el volumen de cada una de la capas corticales ( $V_c$ ) para cada hemisferio es la siguiente:

$$V_c = \Sigma S_c \cdot G_m \quad (1)$$

En donde  $\Sigma Sc$  corresponde a la suma de las superficies de todos los cortes integrantes de la estructura y  $Gm$  al grosor medio de tales cortes.

A su vez, el valor de  $\Sigma Sc$  se calcula por la siguiente expresión:

$$\Sigma Sc = S_1 + (S_1 + S_2/2) \cdot n_1 + S_2 + (S_2 + S_3/2) \cdot n_2 + \dots + S_i \quad (2)$$

En donde  $S_1, S_2, S_3, \dots, S_i$  corresponden al valor de las superficies de cada uno de los cortes elegidos sistemáticamente e incluidos en el estudio, y  $n_1, n_2, n_3, \dots, n_i$  el número de cortes existentes en el intervalo entre dos cortes consecutivos de los elegidos para la valoración.

Por consiguiente, como se deduce de la expresión (2) los valores de superficie correspondientes a los cortes excluidos, son estimados como la superficie media calculada entre los cortes inmediatamente anterior y posterior. El volumen total de la corteza para cada hemisferio se calculó sumando los valores de volumen de cada una de las capas valoradas individualmente.

Con este objetivo, se preparó y calibró el sistema VIDEOPLAN para la determinación de los valores de superficie cortical, que fueron almacenados en los archivos correspondientes para su posterior traslado a una base de datos LOTUS.

#### ***1.4.2.-Determinación de las áreas del soma y núcleo neuronal.***

Para la determinación de las áreas del soma y núcleo neuronal se delinearon con el lápiz digital del sistema videoplan, los contornos mostrados en los cortes teñidos con cresil violeta, por ambos parámetros. Solo aquellas neuronas con un nucléolo patente fueron incluidas en el estudio. El procedimiento de muestreo fue de tipo sistemático, eligiéndose la muestra con los mismos criterios que en el caso de los recuentos (ver más adelante) y considerando por un lado las diferentes capas corticales y por otro el barrido homogéneo de toda la zona de corteza incluida en el estudio. Se utilizó objetivo de inmersión y las medidas de superficie fueron obtenidas en  $\mu m^2$ , previa calibración del sistema videoplan para la obtención de medidas reales.

### *1.4.3.-Determinación de la densidad neuronal y glial.*

La cuantificación de las poblaciones neuronal, neuroglial y astrocitaria, fue efectuada mediante métodos micrométrico-oculares de recuento directo (ver introducción metodológica). Esta técnica permite cuantificar mediante observación microscópica, el número de células presentes en una retícula interpuesta en el ocular que acota el campo de observación previo calibrado micrométrico de su superficie.

Para el desarrollo de la técnica hemos seguido el procedimiento descrito por Konisgmark y col.'70 adaptándolo a las necesidades de nuestro material. La determinación del número total de células en la población (X) se ha llevado a cabo sobre cortes elegidos sistemática y periódicamente, a partir de la siguiente fórmula:

$$X=V.v/x \quad (3)$$

Así, una vez calculado el volumen total de la zona a estudiar (V), los recuentos fueron realizados en un volumen (v) de tejido delimitado por la imagen de la retícula superpuesta sobre el corte. Este volumen de tejido (v) corresponde, por tanto, a la unidad de recuento, y el número de células por unidad de recuento (x/v) corresponde a los valores de densidad celular.

Todas las células contenidas en el interior de la retícula, fueron incluidas en los recuentos. De entre aquellas interceptadas por los bordes, solo las situadas en la parte superior y derecha fueron incluidas.

En el caso de los recuentos efectuados sobre cortes de 10 $\mu$  teñidos con cresil violeta, se utilizó un objetivo de inmersión 100X y una retícula ocular de 3.600  $\mu\text{m}^2$  de superficie. Para el caso de los recuentos efectuados sobre cortes de 30 $\mu$  inmunoteñidos con anti-GFAP, se utilizó un objetivo de 40X y una retícula de 58.564  $\mu\text{m}^2$  de superficie. Tanto la lente objetivo utilizada, como el tamaño de la retícula fueron cuidadosamente elegidos en función de la técnica utilizada en cada caso.

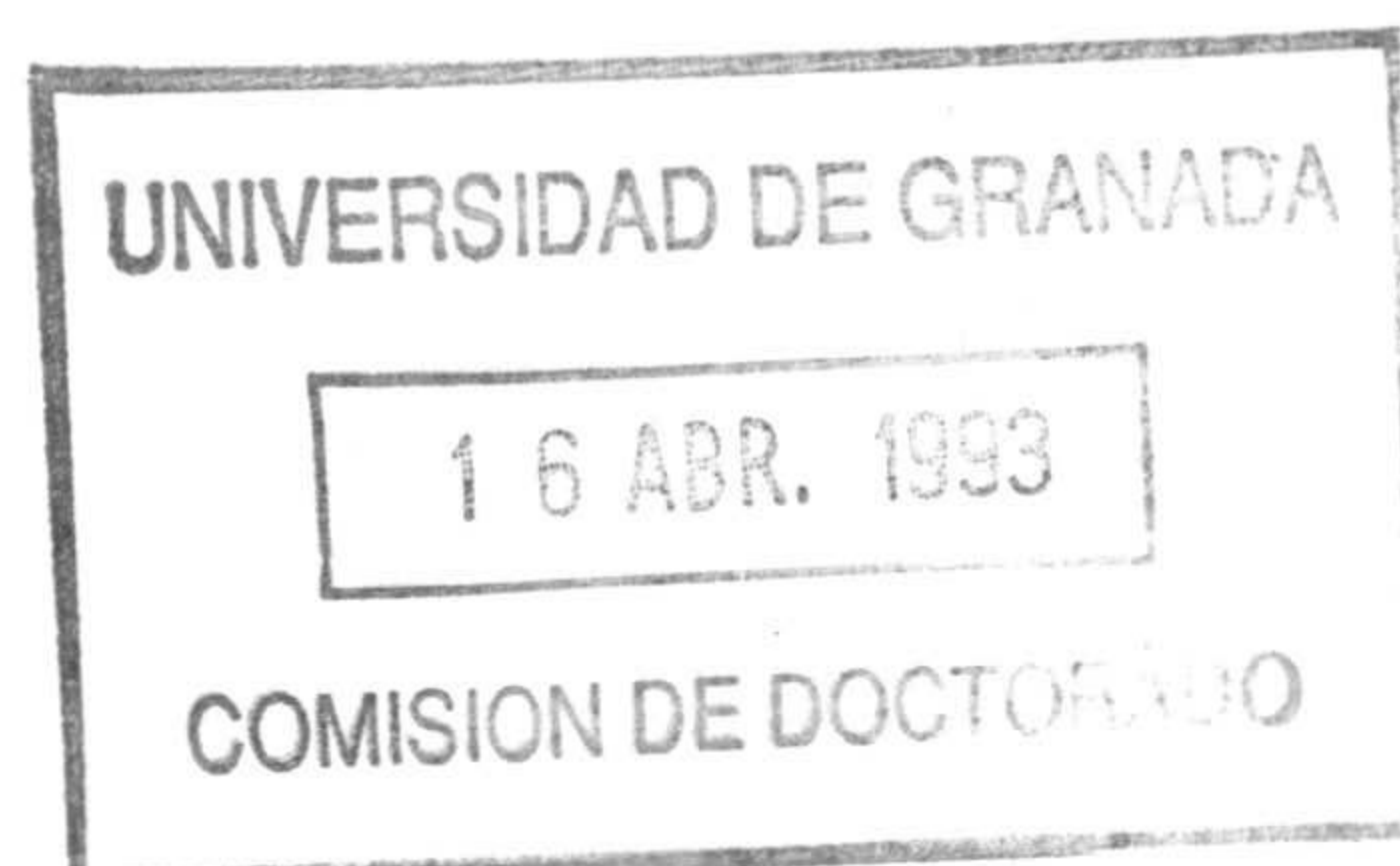
Para incluir las neuronas en los recuentos se utilizó como elemento diferenciador el nucléolo, y en el caso de las células gliales el núcleo (Chow y col'66).



**FIGURA 6M.**-Microfotografía de un sector de la zona estudiada mostrando las neuronas (N) y las células gliales (G), tal como aparecen en los cortes teñidos con cresil violeta y a los aumentos (100X) a que fueron realizados los recuentos. Como puede apreciarse las neuronas presentan nucléolo patente y las células gliales un núcleo netamente definido.

Los criterios utilizados para incluir los astrocitos en los recuentos fueron, (1) núcleo discernible, (2) pericarion teñido positivamente, y (3) prolongaciones citoplasmáticas radiales surgidas del pericarion en forma estrellada (Hansen y col'87).

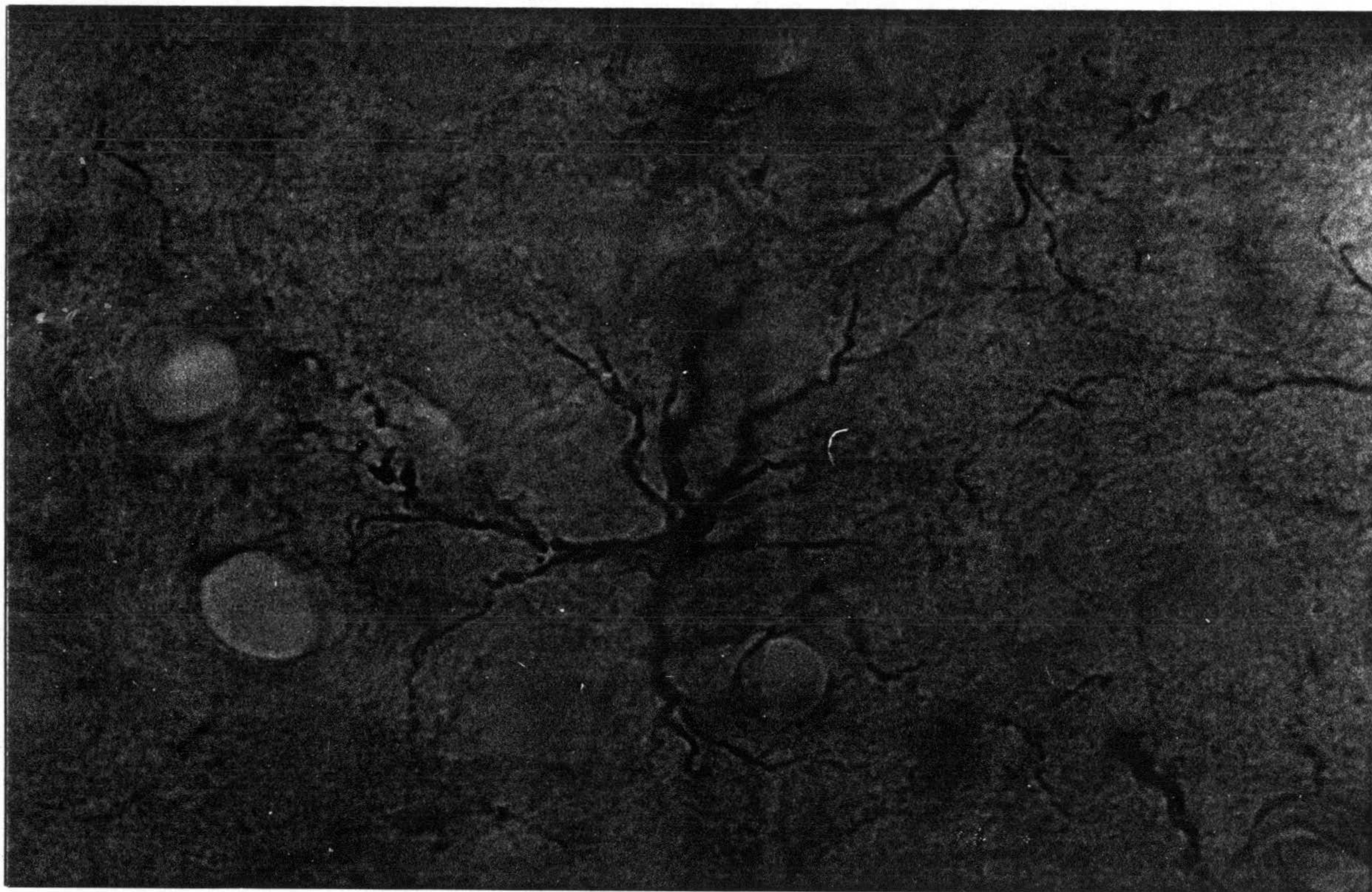
En cuanto al método de muestreo, también en ambos casos (cortes teñidos con cresil violeta y con anti-GFAP), fue realizado de forma sistemática. En el primer caso, considerando en profundidad las capas corticales, I, II-IV, V y VI y realizando un barrido homogéneo en el sentido medio lateral desde la corteza cingulada anterior pasando por la región frontal y hasta el sector FL, de todos los cortes incluidos en el estudio. En el caso de la GFAP, las



## Material y Métodos

---

diferentes capas corticales no pudieron ser distinguidas, pero los recuentos en el sentido dorso ventral, fueron realizados a diferentes profundidades (superficial, media y profunda) desde el borde de la pia hasta la sustancia blanca. Esta forma de proceder condujo a que el número de recuentos (n) en cada caso, no fueran exactamente el mismo aunque sí muy parecido.



*FIGURA 7M.-Microfotografía que muestra una imagen de astrocitos en la que pueden apreciarse las características morfológicas consideradas para incluirlos en los recuentos.*

## **2.-ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS**

### **2.1.-ANIMALES.**

Los animales utilizados para el análisis de parámetros bioquímicos, han correspondido a dos grupos de ratas macho de la raza Wistar, diferenciados según la edad. El primer grupo estaba constituido por 7 animales jóvenes con edades comprendidas entre los 4-6 meses con un peso de 44515 gr. El segundo grupo lo integraban 5 animales viejos con edades comprendidas entre los 32-33 meses y con un peso de 59720 gr. Los animales como en el caso de los estudios morfométricos, fueron criados bajo condiciones controladas con fotoperiodo día/noche de 12h y con alimentación y agua "ad libitum" en la Unidad de Envejecimiento del Estabulario de la Universidad de Granada.

### **2.2.-OBTENCIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO.**

Los animales fueron decapitados y sus cerebros rápidamente extraídos e introducidos en N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente se procedió a la extracción de la corteza frontal mediante disección. Se consideró corteza frontal a toda la corteza anterior a la rodilla del cuerpo calloso. Las muestras correspondientes a los hemisferios derecho e izquierdo así obtenidas, fueron inmediatamente congeladas y almacenadas a -70 C, hasta el momento de su análisis.

#### ***2.1.1.-Homogenizado***

Las piezas de corteza frontal fueron pesadas e introducidas en una solución de tris-clorhidrico 10mM, pH=7.4. A continuación se procedió a su homogeneización y posterior ultracentrifugado a 35.000 rpm durante 30' a 4 C. El sobrenadante obtenido o fracción soluble,



se separó en alícuotas para llevar a cabo las determinaciones de aminoácidos y de la actividad aminopeptidásica. Estas alícuotas fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

### 2.3.- ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR HPLC

Al sobrenadante destinado al estudio de aminoácidos se le añaden 6 nanomoles del standard interno homoserina y se filtra empleando el sistema para filtración de micromuestras ultrafree milipore. Después de la filtración se toman  $40\ \mu\text{l}$  y se derivan como o-oftaldehidomercapto-propioníco derivados siguiendo métodos previamente descritos (Peinado y Myers'88a).

#### 2.3.1.-*Condiciones cromatográficas*

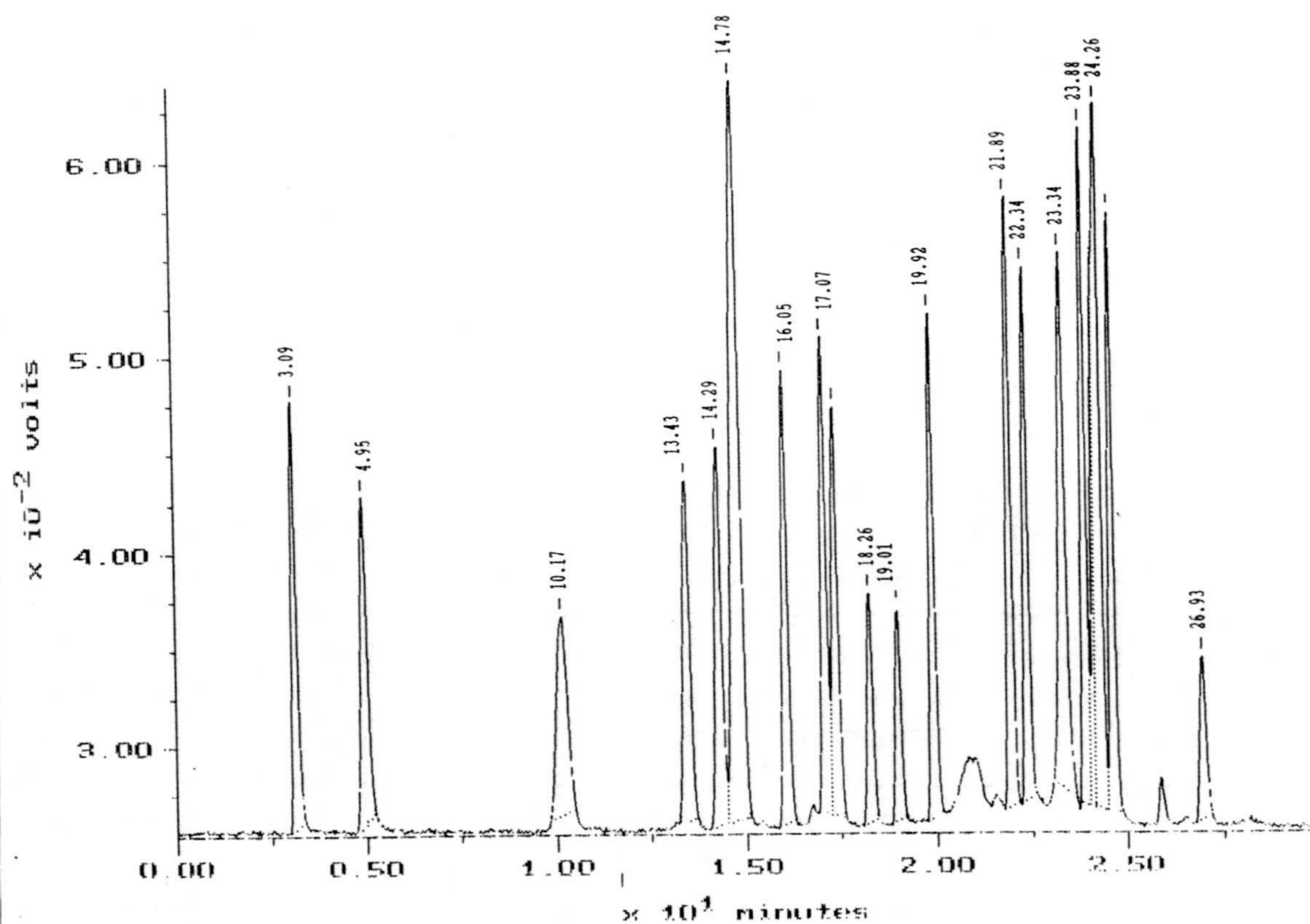
Todas las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo líquido Walters 600- Equipado con detector de fluorescencia Walters mod 420-AC e inyector automático Walters mod.715 ultrawisp. El cálculo de los factores de respuesta relativos, tiempos de retención y cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante la aplicación informática Baseline 810 de Waters. La precolumna y columna analítica utilizada fue Walters Resolve ( $3.9 \times 150\ \text{mm}$ ) C-18 con  $5\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro. Como fase móvil se utilizaron los siguientes disolventes:

Disolvente A.- Buffer fosfato sódico dibásico 0.1M, EDTA 1 mM, ajustando el pH con ClH a 6.3.

Disolvente B.- Acetonitrilo/agua (50:50 v:v).

Ambos disolventes fueron filtrados a través de una membrana de  $0.22\ \mu\text{m}$  de poro y degasificados en corriente de Helio.

La detección se realizó por fluorescencia con un filtro de excitación de 338nm y un filtro de emisión de 425nm (Ver cromatograma n. 1).



*FIGURA 8M.-Cromatograma ilustrativo de la técnica de detección de aminoácidos por HPLC*

#### **2.4.-ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA.**

**Fundamento teórico del método.** Los sustratos utilizados para la determinación fluorimétrica de actividad aminopeptidasica resultan de la condensación de la 2-Naftilamida y el grupo carboxílico de los distintos aminoácidos. Se forma así un enlace amido susceptible de ser hidrolizado por estas enzimas, que liberarían equimolecularmente el aminoácido y la 2-Naftilamina.

## Material y Métodos

---

La 2-Naftilamina liberada fluoresce a 412 nm de emisión cuando se le excita con una longitud de onda de 345nm. La fluorescencia producida durante un intervalo determinado de tiempo es el reflejo de la actividad enzimática de la muestra y puede transformarse en medida de actividad enzimática mediante curvas de calibración, determinando la fluorescencia producida por concentraciones crecientes de 2-Naftilamina disueltas en el mismo buffer en el que se determina la actividad enzimática.

No existe la menor duda sobre la naturaleza aminopeptidásica de las enzimas medidas por este procedimiento, pues cuando se han purificado tanto en sangre como en otros tejidos no muestran capacidad hidrolítica del enlace amido sí el grupo  $\text{NH}_2$  libre de la aminoacil-2-naftilamida es bloqueado (Ellis'63).

El sobrenadante obtenido tras la ultracentrifugación se añade a una solución conteniendo buffer fosfato 0.1 M pH=7.4, DTT (DL-dithiothreitol), albúmina (ambos en concentración de 10 mgr./150 ml de buffer) y el sustrato  $\beta$ -Naftilamida del aminoácido correspondiente (Alanil-2-Naftilamida; L-Aspartil-2-Naftilamida; L- $\alpha$ -glutamil-2-Naftilamida; L-Piroglutamil-2-Naftilamida), y se incuba a 25°C durante 30' en el caso de la determinación de la actividad Alanil-aminopeptidasa y 23-24h en los casos de la Aspartil, Glutamil y Piroglutamil-aminopeptidasa. Pasado el tiempo de incubación la reacción se detiene con buffer acetato 0.1M pH=4.2. A continuación la actividad aminopeptidásica se determina por fluorimetría (Kontron SFM 25) utilizando como blanco la solución de sustrato sin la presencia de muestra.

Los valores obtenidos son transformados en pmoles/l/min por mg de tejido mediante una ecuación de una línea recta obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes de 2-Naftilamida en un medio idéntico al de la solución de sustrato.

### 3.-ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los datos correspondientes a los diferentes parámetros morfológicos y neuroquímicos fué efectuado, mediante el paquete estadístico *STATGRAFICS VER 5.0*. Con este objetivo, los datos correspondientes a todos los parámetros evaluados en los diferentes individuos, fueron organizados en archivos adecuados al tratamiento estadístico en una base de datos *LOTUS*, e importados desde *Statgrafics* para su procesamiento.

Se comenzó el análisis de los diferentes parámetros para cada individuo independientemente al objeto de evaluar, en primer lugar, el grado de homogeneidad o en su caso heterogeneidad existente entre los individuos de la misma edad. En segundo lugar, se analizaron conjuntamente los datos procedentes de cada grupo de edad, es decir "jóvenes" versus "viejos" al objeto de establecer si alguno de los parámetros analizado podía considerarse edad dependiente.

Cada una de las variables incluida en el estudio se sometió al siguiente protocolo:

1.-Análisis estadístico básico, con el cálculo del tamaño de la muestra, media, mediana, moda, varianza, desviación standard, error standard, valor máximo y valor mínimo.

2.-Estudio de la distribución y bondad de ajuste de los datos obtenidos para cada variable, a las siguientes distribuciones: normal, gamma, binomial negativa y poisson, utilizando para las variables discretas (recuentos) el test de la Chi-cuadrado y para las continuas (superficies, niveles de aminoácidos, actividad aminopeptidásica) el de Kolmogorov-Smirnov.

3.-Los valores medios de todos los parámetros estudiados según el individuo y la zona analizada, fueron sometidos a un análisis de varianza de dos vías. Cuando no se verificaba la hipótesis de la ANOVA se hizo uso de un análisis de varianza por rangos (Kruskal-Wallis). En los casos en que se encontró significación se aplicó el test de Newman-Keuls para establecer la existencia de posibles grupos edad-dependientes.

4.-Aplicación de los correspondientes test de comparación para cada parámetro entre jóvenes y viejos. En el caso de variables no ajustables a distribuciones normales los datos se trataron mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

5.-Finalmente, todos los valores medios de los diferentes parámetros han sido sometidos al test de correlación por rangos de Spearman, para determinar la dependencia o independencia existente entre los mismos.

## 4.-PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### 4.1.-EQUITHENSIN

Para la preparación de equithensin se disolvieron en estricto orden, los siguientes compuestos:

- 21,25 gr de Hidrato de cloral en 49,4 ml de etanol absoluto
- A continuación se añadieron 4,8 gr de pentobarbital sódico previamente disueltos en 81 ml de agua bidestilada
- Posteriormente, se añadieron 198 ml de 1,2- propilenglicol
- A la solución así obtenida se añadieron 10,63 gr de sulfato de magnesio, previamente disueltos en 50 ml de agua bidestilada
- La solución se completó hasta 500 ml de agua bidestilada

### 4.2.-TAMPON FOSFATO (PB) 0,2M PH=7,4

Solución A (ácido): Disolver 27.6 gr de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$  (PM=137) en 1 litro de agua destilada.

Solución B (base): Disolver 71.7 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  (PM=358) en 1 litro de agua destilada.

Para pH=7.4, mezclar A/B en proporciones 19/81.

### 4.3.-SOLUCIÓN LAVADORA (1 LITRO)

$\text{H}_2\text{O}$ .....950 ml  
PB 0.2M pH=7,4.....50 ml  
ClNa.....8 gr  
ClK.....0,25 gr  
 $\text{CO}_3\text{HNa}$ .....0,5 gr

**4.4.-TAMPON FOSFATO SALINO (PBS) 0,1 M PH=7,4 (1 LITRO)**

PB 0,2M pH=7,4.....50 ml  
NaCl.....8,76 gr  
KCl.....200 mg  
H<sub>2</sub>O.....950 ml

**4.5.- SOLUCIÓN FIJADORA LIQUIDO DE CARNOY**

60:30:10 (v/v/v); Etanol absoluto/Cloroformo/Acido acético.

**4.6.- SOLUCIÓN FIJADORA DE PARAFORMALDEHIDO (PFA) AL 4%.**

-Se mezclan a partes iguales PFA al 8% y PB 0,2M por lo que queda PFA al 4% y 0,1 M.

-El PFA al 8% se prepara añadiendo 40 gr de PFA a 400 ml de agua destilada, calentar a 80° C, añadir NaOH 1N gota a gota, hasta que quede trasparente (generalmente de 5-6 gotas), enfriar y filtrar. Completar con agua destilada hasta 500 ml.

**4.7.- SOLUCIÓN COLORANTE DE CRESIL-VIOLETA**

Para obtener el colorante se mezclan en proporciones 1:1 las dos disoluciones siguientes (solución madre y tampon).

-Solución madre: Solución acuosa de acetato violeta de cresilo al 0,1%.

-Solución tampon: Se obtiene mezclando 500 ml de una solución acuosa 0,01 M de trihidroximetilaminometano con 21,5 ml de otra solución acuosa de ácido acetico glacial al 1%.

#### **4.8.-REACTIVO DE DERIVACIÓN. OPA.**

La preparación de este reactivo se hizo de la siguiente forma:

- Se pesaron 16mg. de O-ftalaldeido y se disolvieron en 400 $\mu$ l. de metanol.
- A esta disolución se añadieron 3.57 $\mu$ l. de buffer borato.
- Posteriormente, se completó la mezcla reactiva con 27 $\mu$ l. de ácido 3-mercaptopropinóico.



## Resultados

---

# RESULTADOS

## 1.-RESULTADOS MORFOMETRICOS

Se relacionan los resultados obtenidos en el análisis de parámetros morfológicos los cuales incluyeron: volumen total de la corteza frontal, densidad neuronal, densidad glial y superficies del soma y núcleo neuronal. Se describe la correlación entre los diferentes parámetros estudiados al objeto de poder establecer la influencia del envejecimiento no solo sobre cada uno de ellos sino sobre el conjunto de los mismos. Todos estos datos han sido estudiados a partir de preparaciones obtenidas por la técnica del cresil violeta.

Posteriormente, se exponen los resultados obtenidos a partir de preparaciones tratadas con la técnica inmunocitoquímica para la proteína fibrilar ácida (GFAP).

### 1.1.- VOLUMEN DE LA CORTEZA FRONTAL.

En la tabla 1R se muestran los resultados volumetricos obtenidos para cada uno de los individuos integrados en el estudio. Se detalla la contribución de las diferentes capas (I, II-IV, V y VI) al volumen cortical total de los individuos jóvenes y viejos.

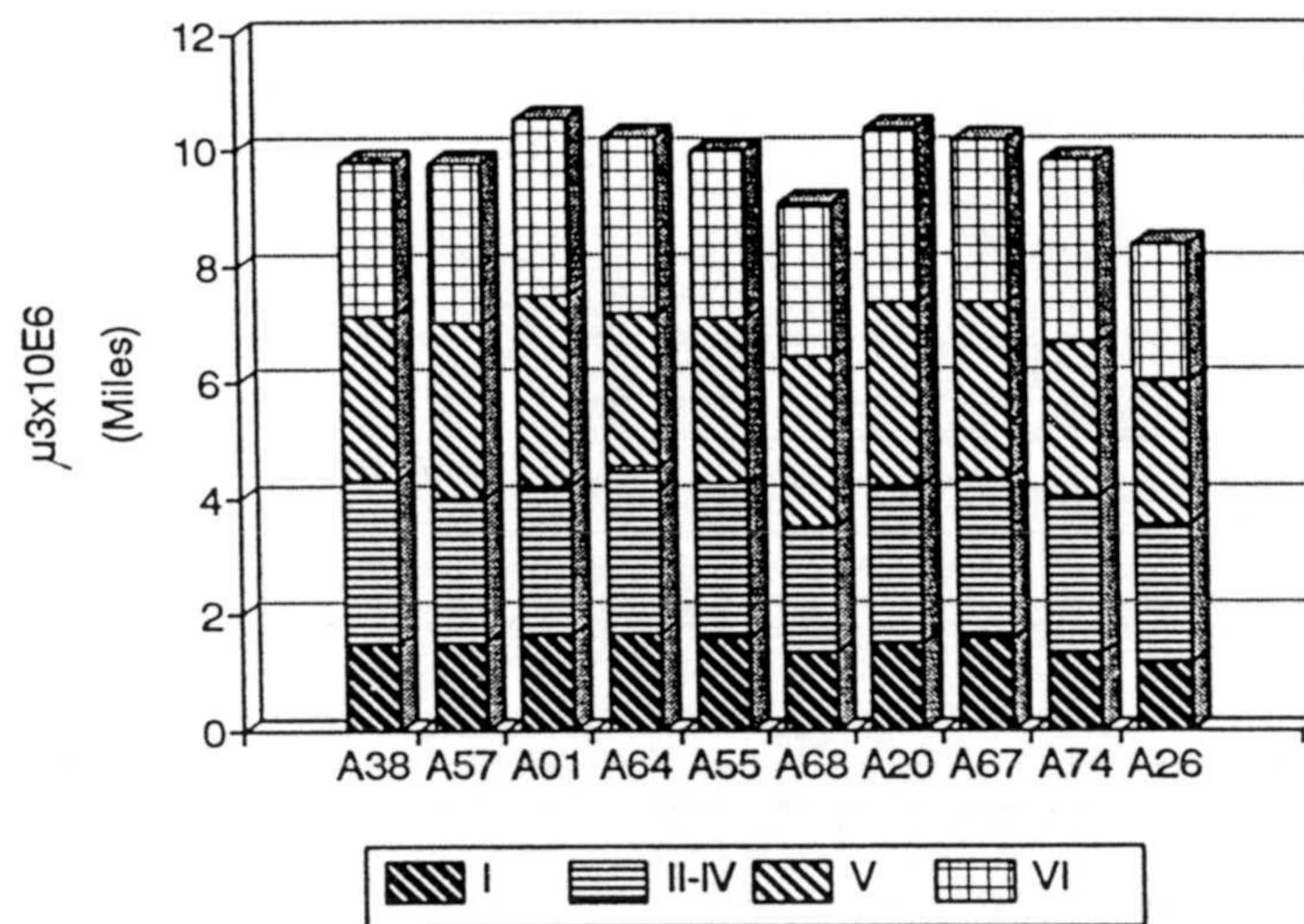
El análisis de los resultados evidenció un comportamiento similar entre los individuos jóvenes. Por el contrario, se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.005$ ) entre los animales viejos. Específicamente el volumen cortical para el individuo A26 mostró un rango inferior al de los demás del mismo grupo. (Ver figuras 1R y 2R).

En las figuras 3R y 4R se representan los valores ( $\text{media} \pm \text{ES}$ ) obtenidos para el volumen de las capas I, II-IV, V y VI y de la totalidad de la corteza frontal para los individuos jóvenes y viejos. En todos los casos, los valores obtenidos mostraron una tendencia a disminuir en los individuos viejos. Sin embargo el análisis estadístico no reveló diferencias significativas para ninguna de las capas estudiadas ni para la totalidad de la corteza entre los dos grupos de edad.

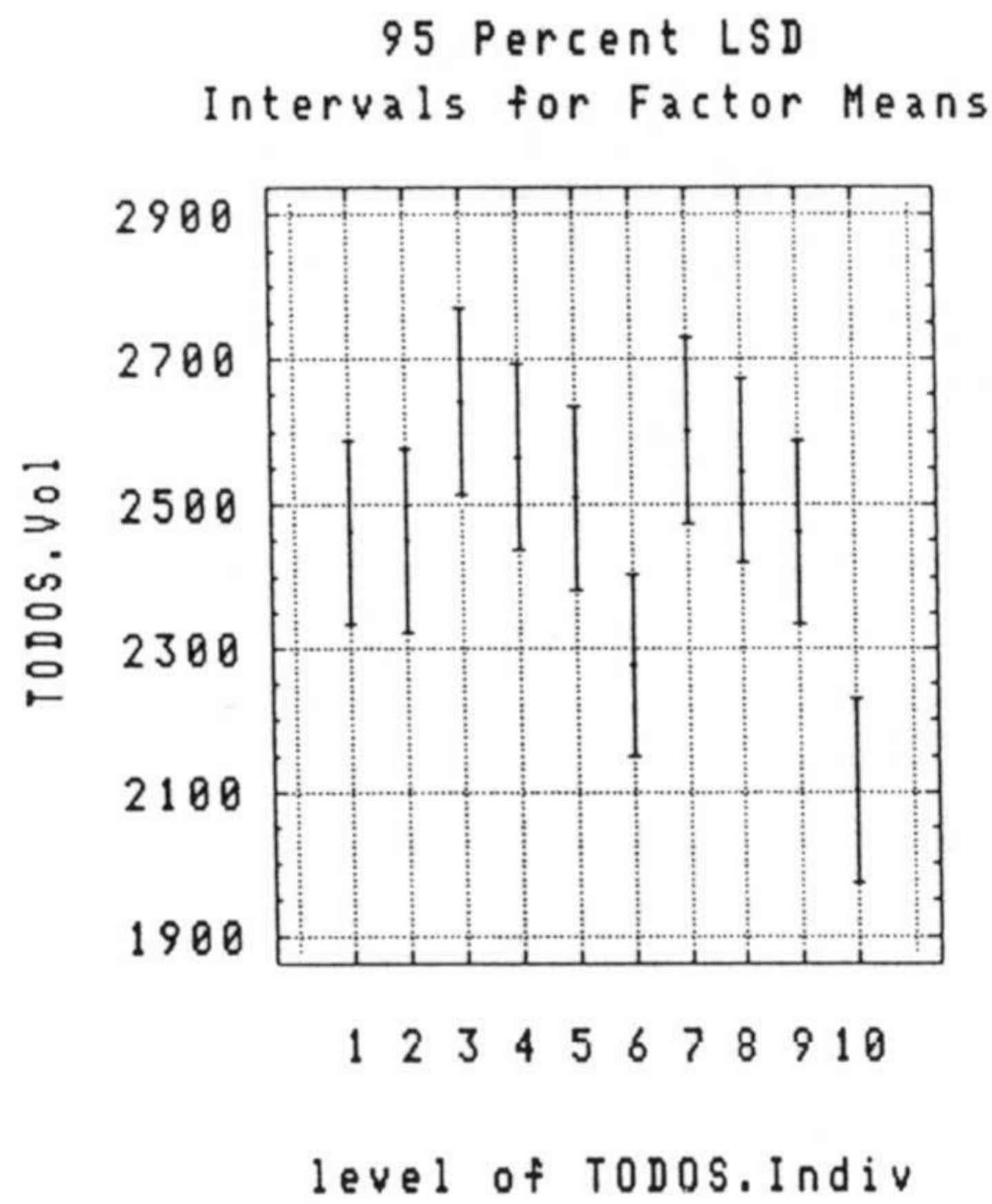
	I	II-IV	V	VI	Total
A38	1490	2831	2852	2671	9844
A57	1517	2483	3027	2772	9799
A01	1653	2560	3292	3063	10568
A64	1692	2880	2641	3051	10264
A55	1601	2674	2847	2912	10034
JOVENES	1591.6± 39.02 n=5	2685.6± 76.12 n=5	2931.8± 108.84 n=5	2913.8± 63.86 n=5	10101.8± 142.54 n=5
A68	1343	2154	2958	2652	9107
A20	1499	2706	3159	3042	10406
A67	1569	2762	3025	2829	10185
A74	1314	2706	2655	3169	9844
A26	1148	2393	2485	2380	8406
VIEJOS	1374.6± 73.92 n=5	2544.2± 117.24 n=5	2896.4± 114.07 n=5	2774.4± 118.95 n=5	9589.6± 824.55 n=5

*TABLA 1R.-Volúmenes correspondientes a las capas corticales I, II-IV, V y VI y a la totalidad de la corteza, en individuos jóvenes (A7, A57, A1, A64, A55) y viejos (A68, A20, A67, A74, A26). Las filas señaladas como JOVENES y VIEJOS, representan los valores medios, obtenidos en los hemisferios derechos, de los 5 individuos jóvenes y de los 5 viejos. Los resultados (media±ES) se expresan en  $\mu\text{m}^3 \times 10^6$ .*

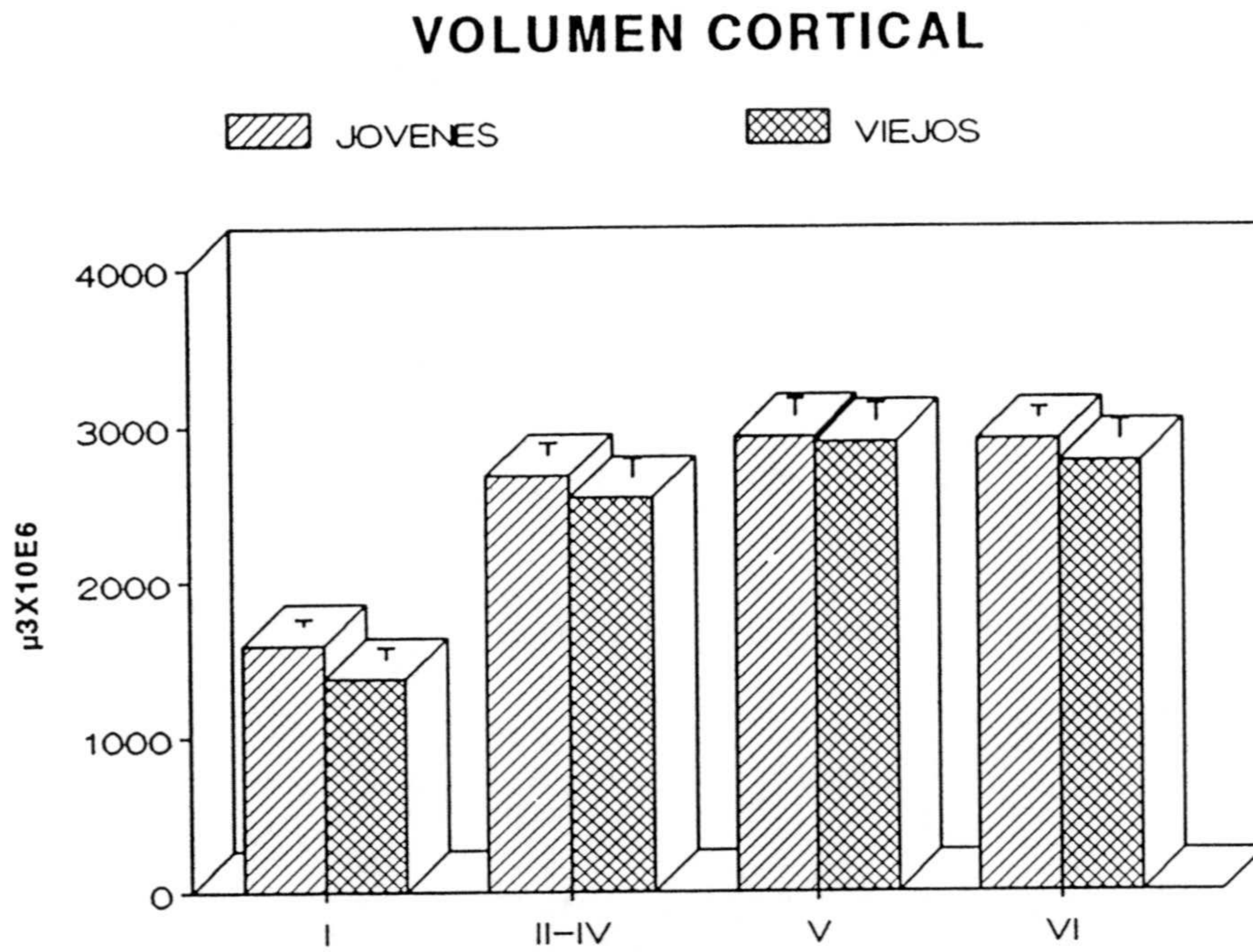
### VOLUMEN CORTICAL



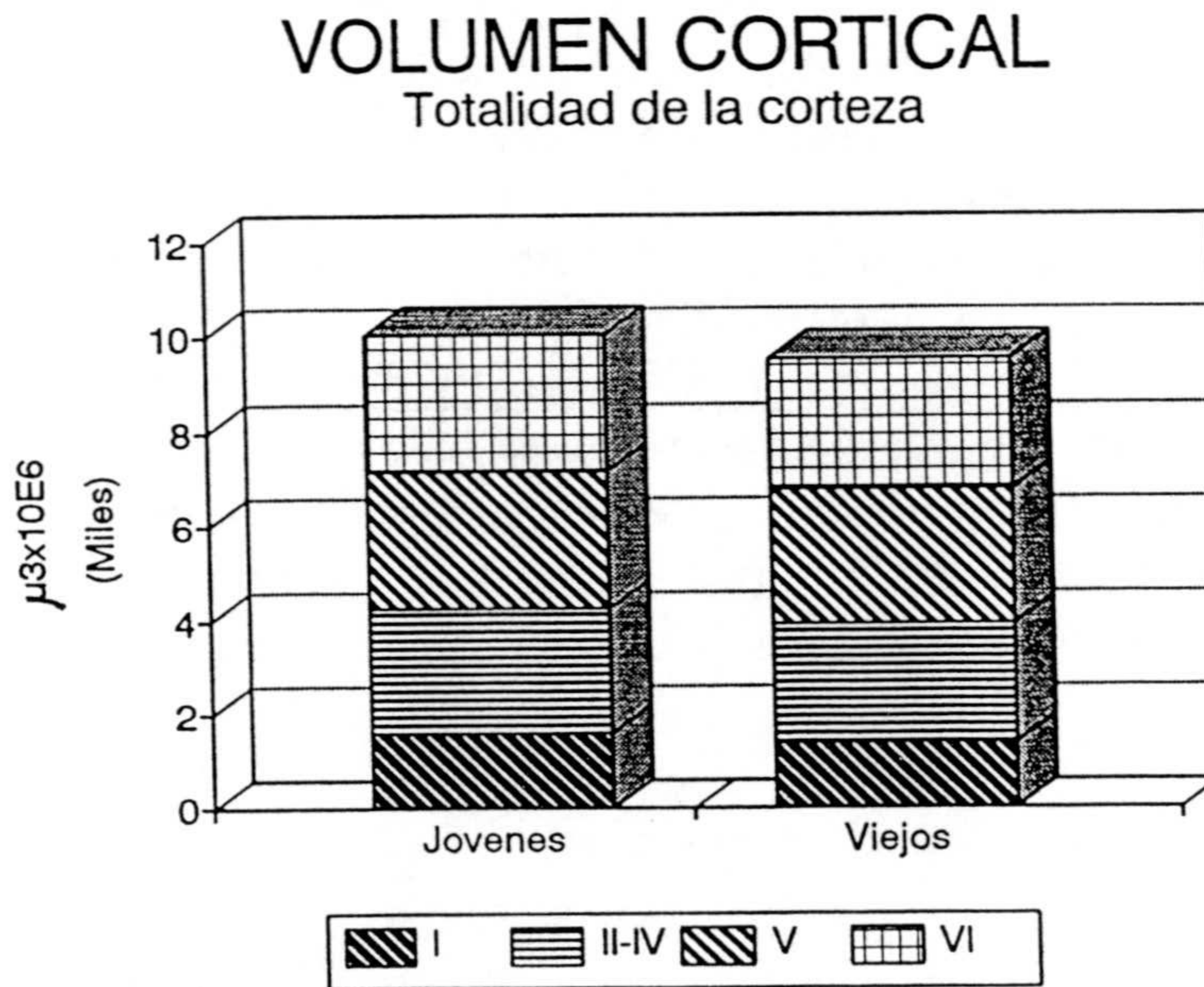
**FIGURA 1R.**-Representación de los volúmenes de la corteza frontal para los diferentes individuos estudiados. Cada barra muestra la contribución de las capas I, II-IV, V y VI, a la totalidad de la corteza. Jóvenes (A38, A57, A01, A64, A55). Viejos (A68, A20, A67, A74, A26).



**FIGURA 2R.**-Representación gráfica de los valores medios del volumen de la corteza frontal de cada individuo por el método de intervalos de confianza del 95%. Jóvenes (A38:1, A57:2, A01:3, A64:4, A55:5). Viejos (A68:6, A20:7, A67:8, A74:9, A26:10).



**FIGURA 3R.**- Representación de los valores volumetricos (*media±ES*) de las capas corticales I, II-IV, V y VI de la zona de corteza frontal en los individuos jóvenes respecto a los viejos.



**FIGURA 4R.**-Representación de los valores volumetricos medios correspondientes a la totalidad de la corteza frontal en los individuos jóvenes y viejos. Se muestra la contribución de cada capa (I, II-IV, V y VI) al volumen total cortical.

## 1.2.-DENSIDAD NEURONAL EN LA CORTEZA FRONTAL.

En la tabla 2R se muestran los resultados obtenidos para la densidad neuronal (número medio de neuronas por unidad de volumen) en cada uno de los diez individuos estudiados. Se detallan los valores correspondientes a las diferentes capas (I, II-IV, V y VI) y al total de la corteza frontal de individuos jóvenes y viejos.

El análisis de varianza realizado, no detectó diferencias significativas entre los distintos individuos. (Ver figuras 5R y 6R).

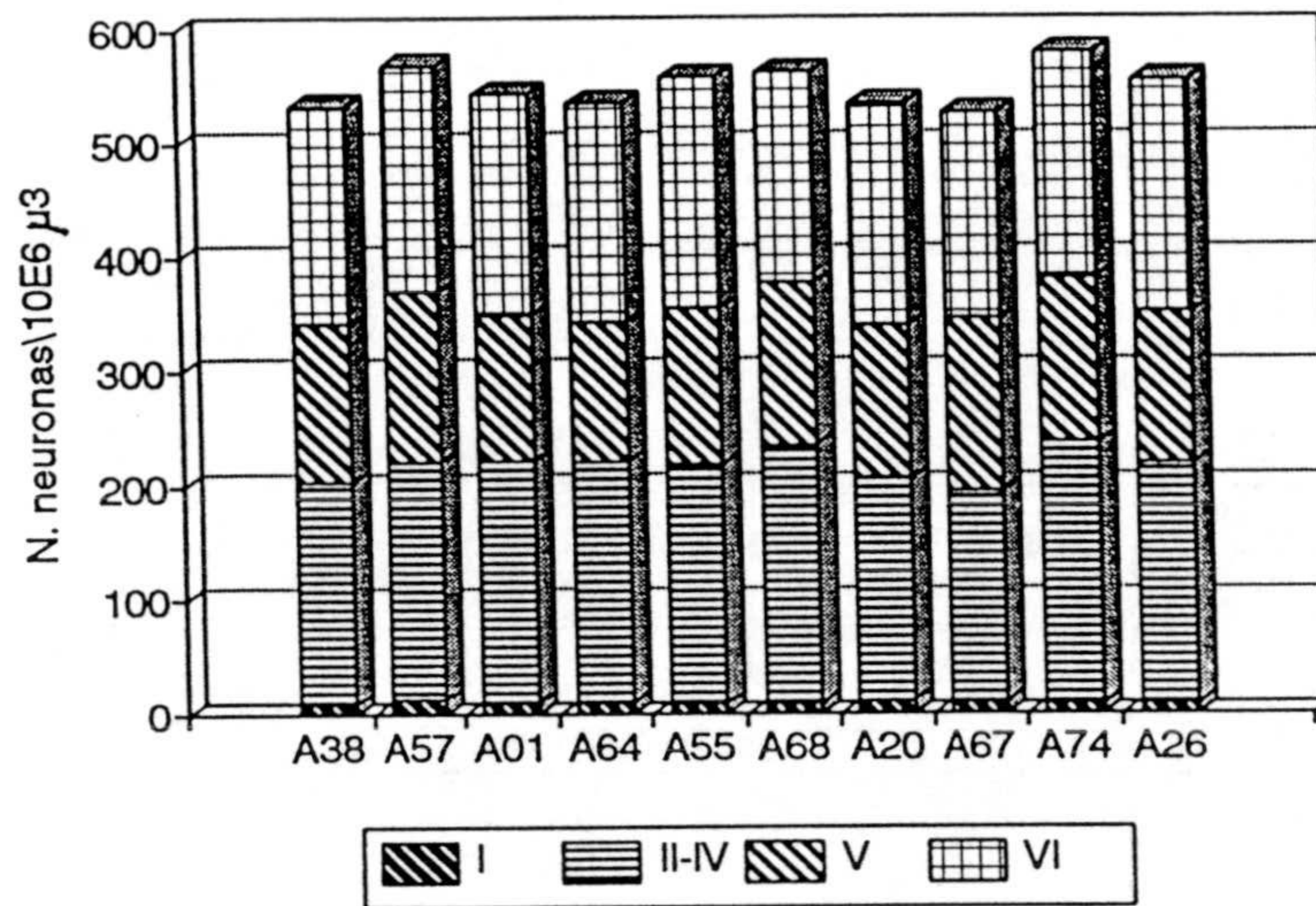
En las figuras 7R y 8R se representan los valores de densidad neuronal ( $Media \pm ES$ ), en cada capa cortical (I, II-IV, V y VI) (7R) y en la totalidad de la corteza frontal (8R), para jóvenes y viejos. El test de comparación efectuado (Mann-Whitney), tampoco reveló diferencias significativas entre ambos grupos de edad, ni para cada una de las capas considerada individualmente, ni para la totalidad de la corteza.



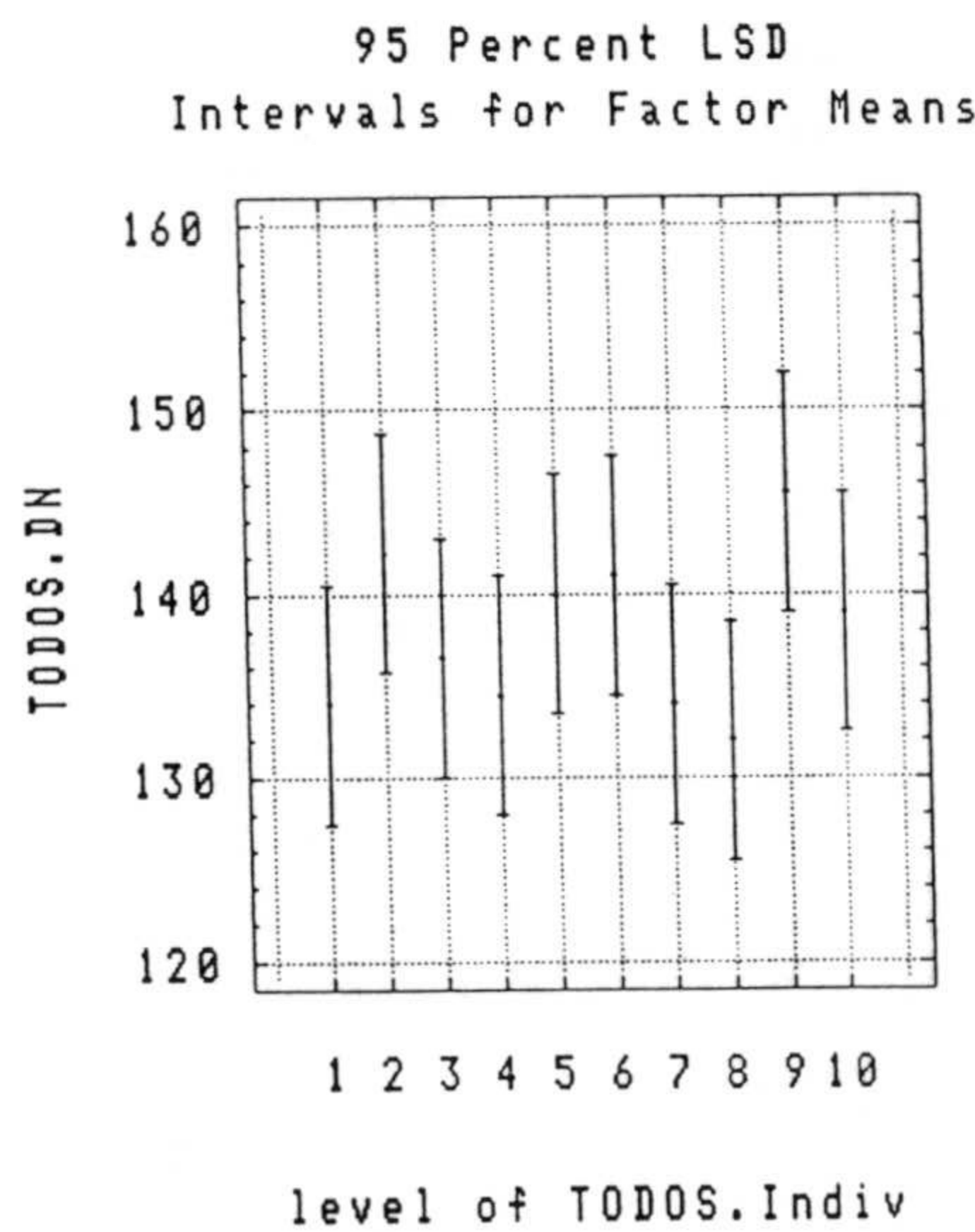
	I	II-IV	V	VI	Totales
A38	9±1 n=110	195±5 n=110	139±4 n=110	193±5 n=110	134±4 n=440
A57	12±2 n=95	208±6 n=95	150±5 n=98	199±7 n=98	142±5 n=389
A01	10±1 n=112	213±7 n=94	128±4 n=94	195±6 n=94	137±5 n=394
A64	10±1 n=112	211±6 n=117	123±5 n=117	194±5 n=118	135±4 n=464
A55	9±1 n=112	210±6 n=114	137±4 n=114	204±6 n=114	140±4 n=454
JOVENES	10±1 n=537	207±3 n=534	135±2 n=533	196±3 n=534	138±2 n=2138
A68	8±1 n=96	227±7 n=98	43±4 n=98	186±4 n=98	141±4 n=390
A20	11±2 n=94	196±7 n=95	134±5 n=95	195±8 n=84	134±6 n=368
A67	10±2 n=112	186±6 n=114	150±5 n=114	182±7 n=114	132±5 n=454
A74	8±1 n=109	230±7 n=110	144±5 n=110	200±6 n=110	145±5 n=439
A26	8±1 n=116	211±5 n=116	133±4 n=116	204±6 n=116	139±4 n=464
VIEJOS	9±1 n=527	209±3 n=533	140±3 n=533	193±3 n=522	138±2 n=2115

**TABLA 2R.**-Densidades neuronales (**media±ES**) de las diferentes capas corticales (I, II-IV, V y VI) y del total de la corteza frontal en cada uno de los individuos jóvenes (A7, A57, A01, A64, A55) y viejos (A68, A20, A67, A74, A26). Igualmente se expresan los valores medios obtenidos para cada grupo de edad. Los resultados se expresan en n° de neuronas/ 10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup>. "n" representa el tamaño de la muestra

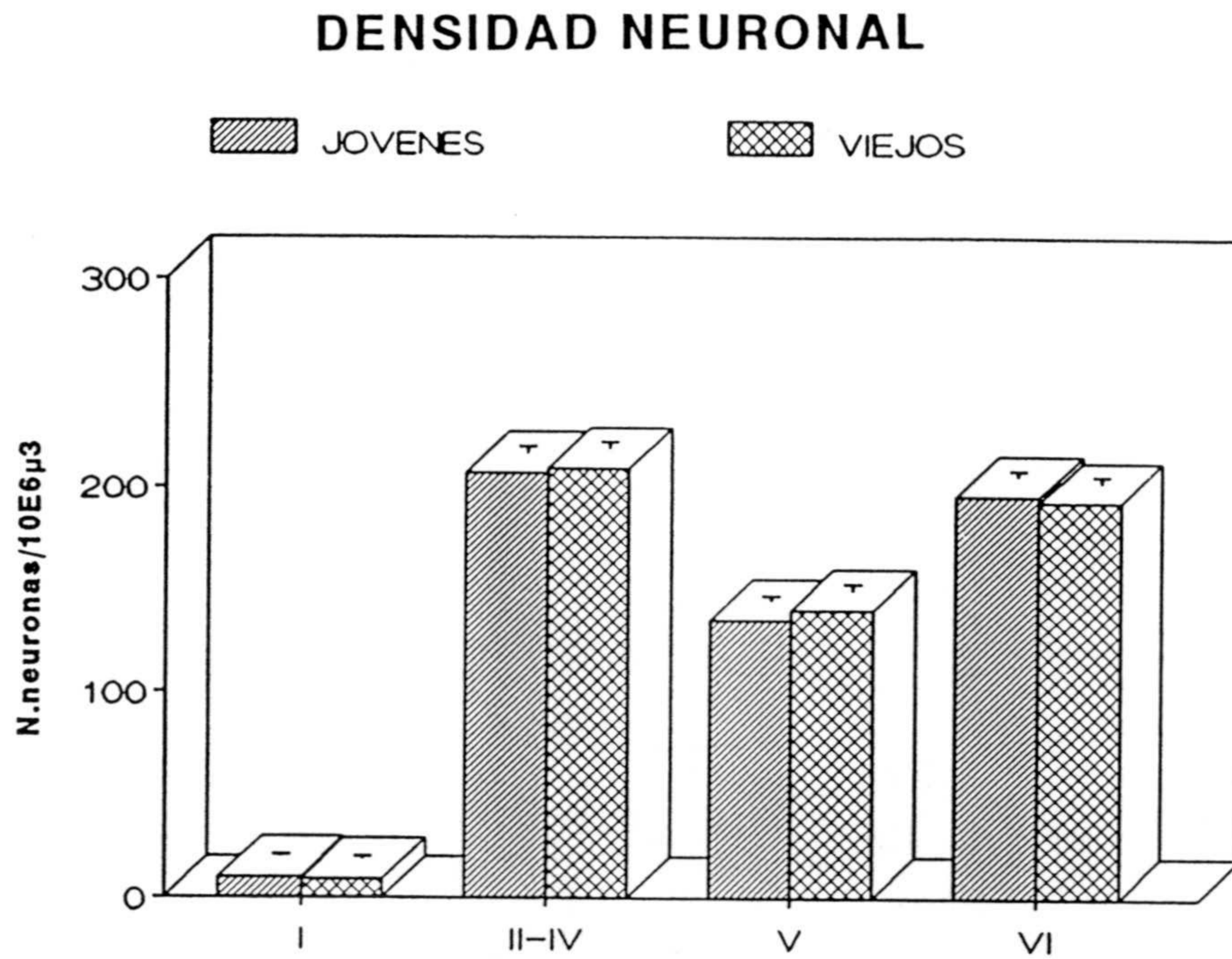
### DENSIDAD NEURONAL



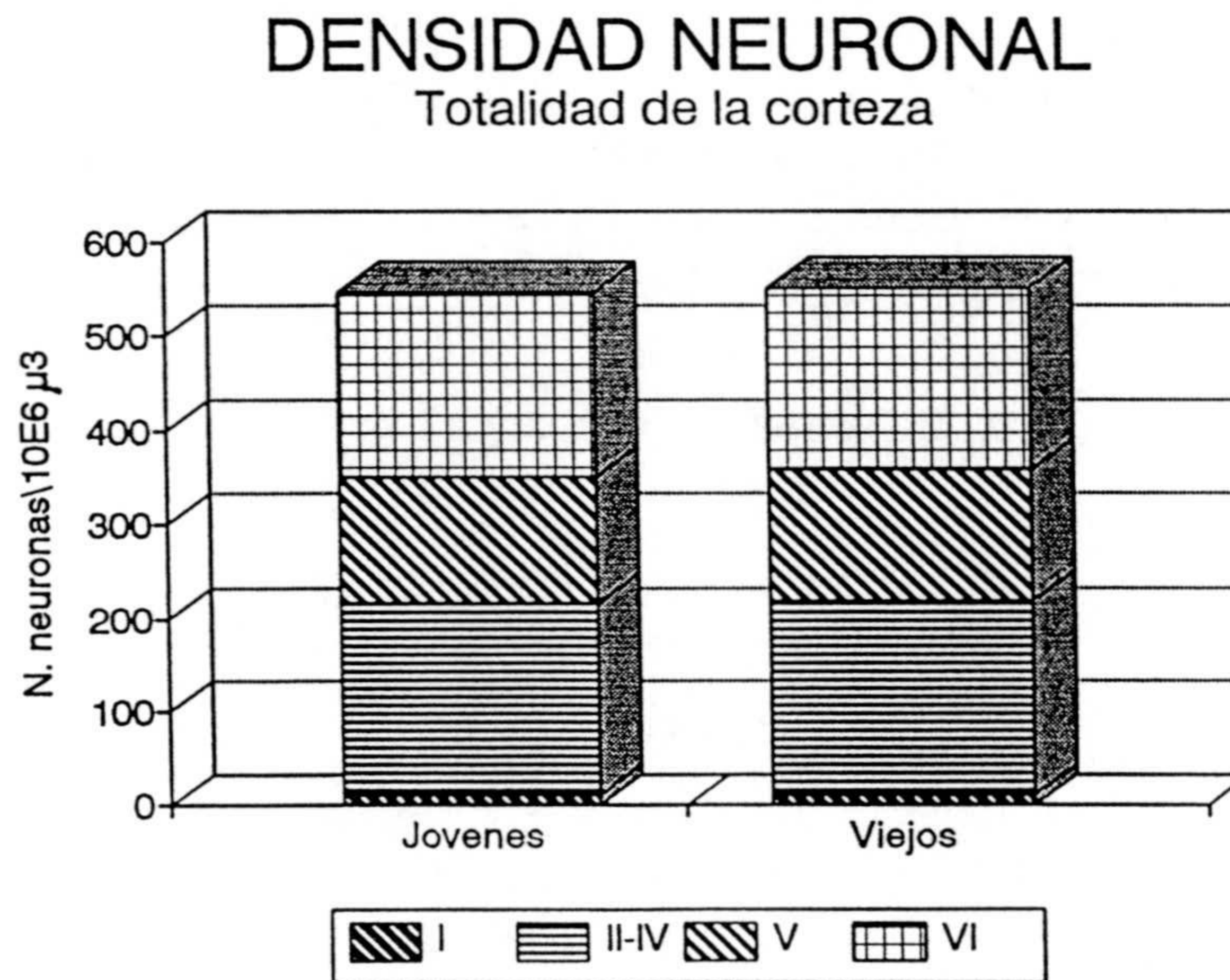
**FIGURA 5R.-** Representación de los valores de densidad neuronal media para el conjunto de la corteza en los diferentes individuos estudiados. Cada barra muestra la contribución de cada capa (I, II-IV, V y VI) a la totalidad de la corteza. Jóvenes (A36, A57, A01, A64, A55). Viejos (A68, A20, A67, A74, A26).



**FIGURA 6R-** Representación gráfica de los valores medios de densidad neuronal de cada individuo por el método de intervalos de intervalos de confianza del 95%. Jóvenes (1:A36; 2:A57; 3:A01; 4:A64; 5:A55). Viejos (6:A68; 7:A20; 8:A67; 9:A74; 10:A26).

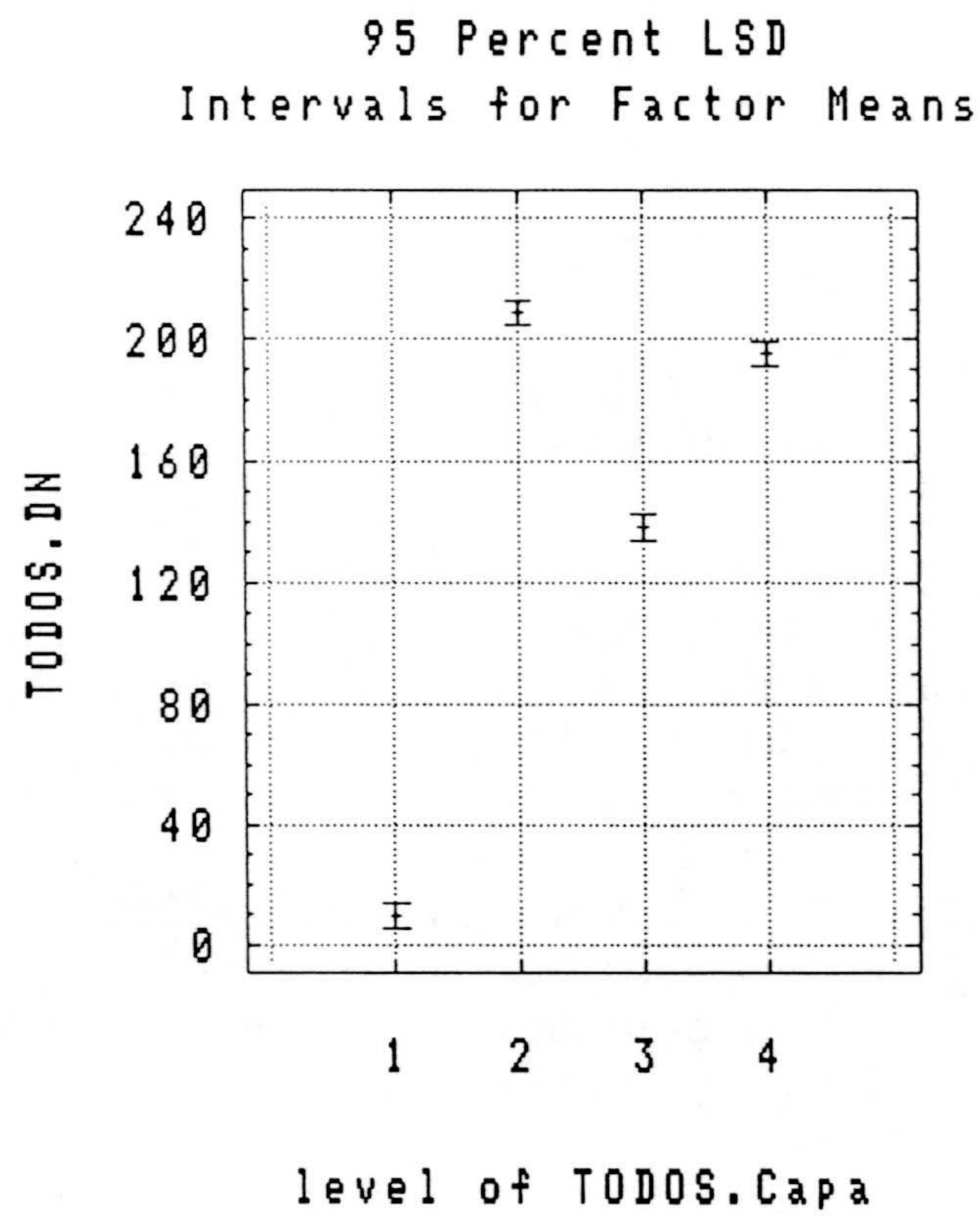


**FIGURA 7R.** Representación de los valores (media±ES) de densidad neuronal en cada una de las capas corticales I, II-IV, V y VI de los individuos jóvenes y viejos. Los resultados se expresan en número de neuronas /10<sup>6</sup>µ<sup>3</sup>.



**FIGURA 8R.** Representación de los valores de densidad neuronal media correspondientes a la totalidad de la corteza frontal en los individuos jóvenes y viejos. Cada barra muestra apiladas las cuotas correspondientes a las diferentes capas corticales (I, II-IV, V y VI).

Finalmente cabe destacar, que independientemente de la edad existe un patrón común de densidad neuronal a todos los individuos estudiados. En todos los casos, los valores más elevados para este parámetro correspondieron a la capa II-IV, seguida de las capas VI y V. La capa I presentó valores comparativamente más bajos que todas las demás. Estos resultados han sido corroborados estadísticamente mediante la realización de la correspondiente ANOVA tomando como factor discriminante la capa cortical. La prueba efectuada indicó la existencia de diferencias significativas entre las capas ( $p < 0.01$ ). El test de rango múltiple (Newman-Keuls) realizado, clasificó la densidad neuronal en cuatro grupos correspondientes a cada una de las capas corticales consideradas (Ver figura 9R).



**FIGURA 9R**-Representación gráfica de los valores medios de densidad neuronal en cada capa cortical por el método de intervalos de confianza del 95%. (Capas I:1; II-IV:2; V:3; VI:4).

### 1.3.-DENSIDAD GLIAL EN LA CORTEZA FRONTAL.

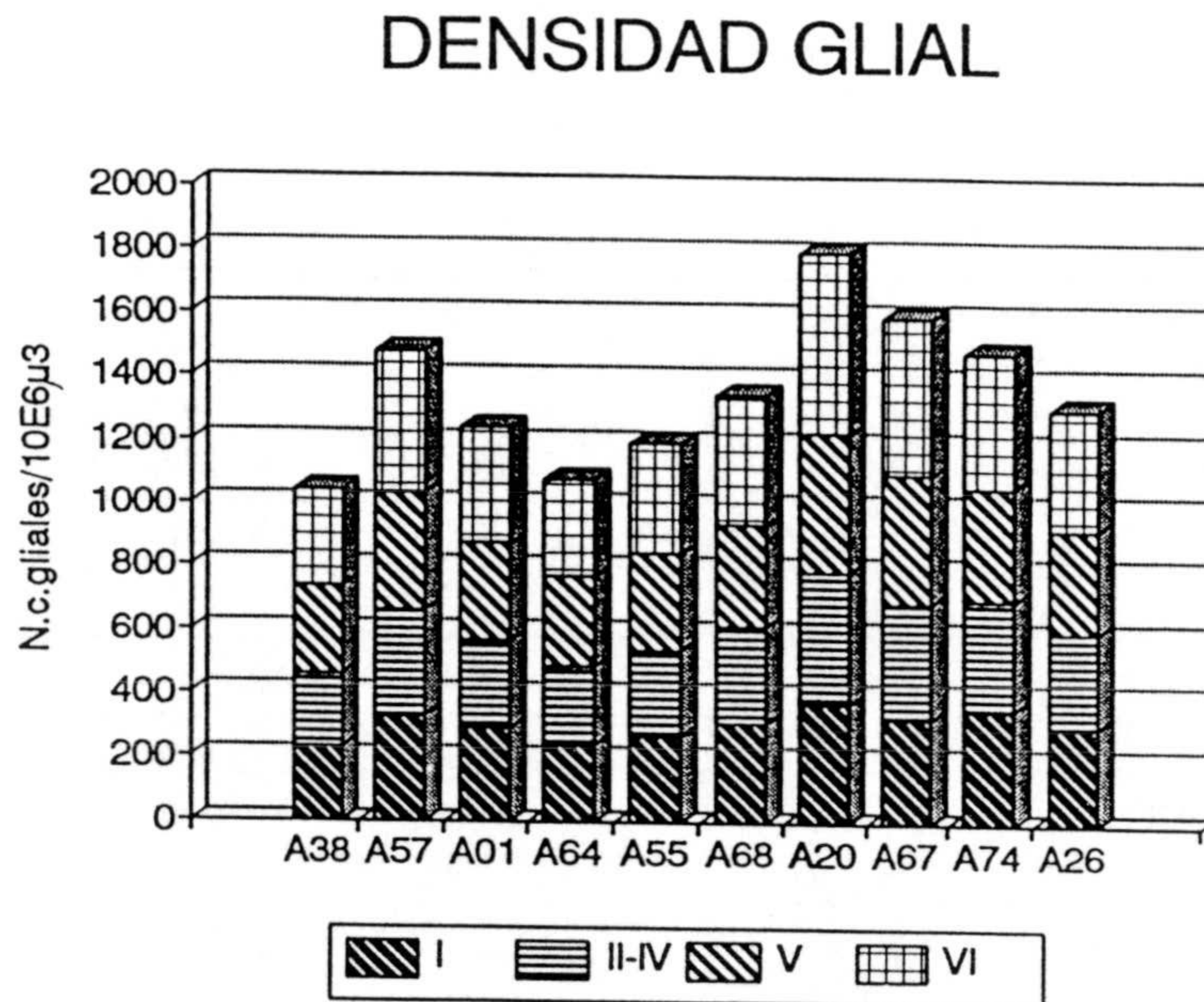
En la tabla 3R se muestran los resultados obtenidos para la densidad glial (número medio de células gliales por unidad de volumen) en cada uno de los diez individuos estudiados. Se detallan los valores correspondientes a las diferentes capas (I, II-IV, V y VI) y al total de la corteza frontal de individuos jóvenes y viejos.

El análisis de varianza realizado, detectó diferencias significativas entre los diferentes individuos ( $p < 0.01$ ) (Ver figuras 10R y 11R). Como puede observarse, y a pesar de que el test de rango multiple realizado, indicó un solapamiento entre el individuo joven de densidad glial más alta (A57) y el viejo de densidad glial más baja (A26), se puede considerar que existen dos grupos respecto a este parámetro, uno con valores inferiores (el de los jóvenes) y otro con valores más elevados (el de los viejos).

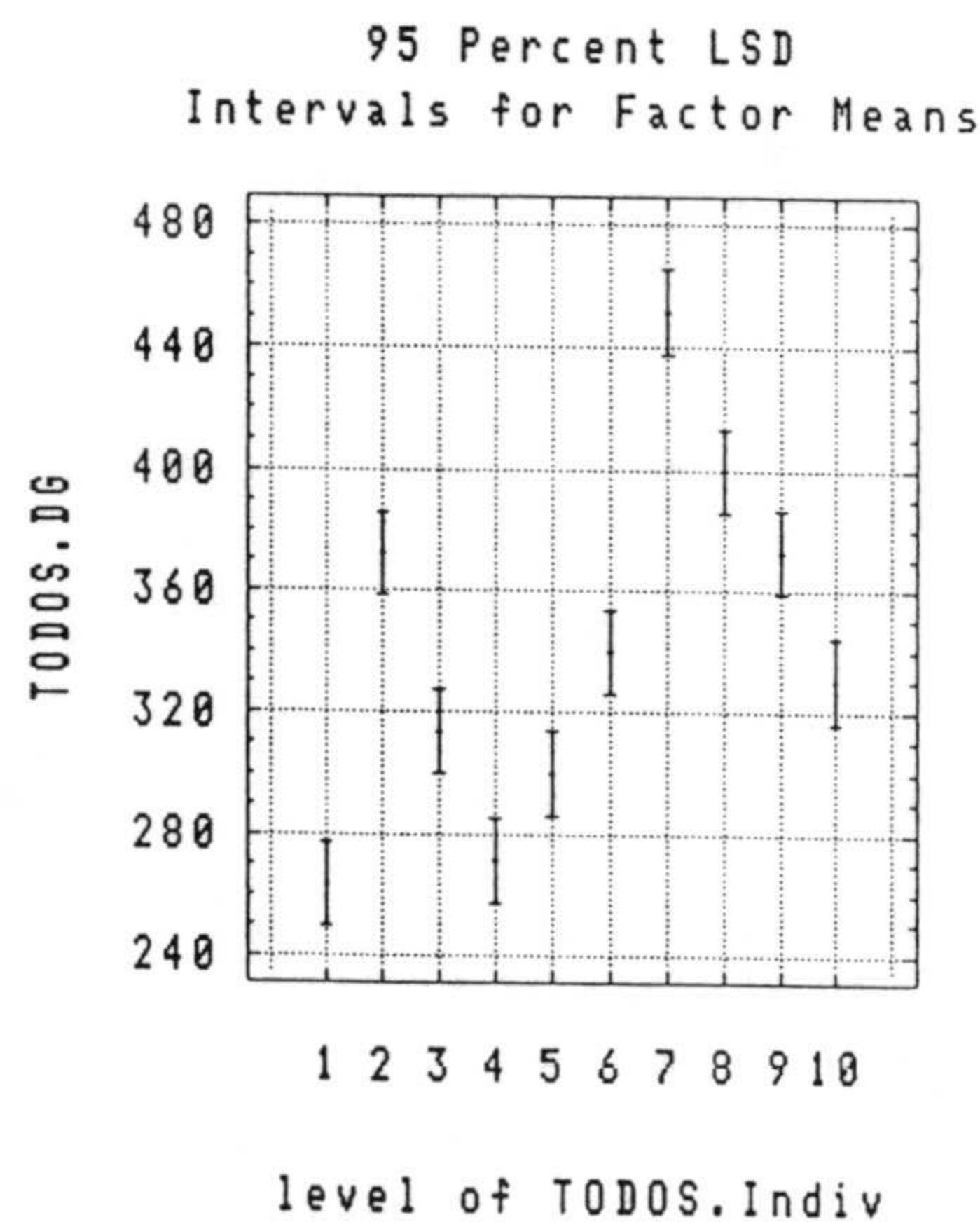
En las figuras 12R y 13R se representan los valores de densidad glial media ( $\text{Media} \pm \text{ES}$ ) en cada capa cortical (I, II-IV, V y VI) (12R) y en la totalidad de la corteza frontal (13R) para jóvenes y viejos. El test de comparación efectuado (Mann-Whitney) entre ambos grupos de edad, detectó la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), en todas las capas corticales y en la totalidad de la corteza.

	I	II-IV	V	VI	Totales
A38	231±6 n=110	232±7 n=110	281±7 n=110	309±6 n=110	263±7 n=440
A57	328±8 n=95	337±8 n=98	375±8 n=98	448±11 n=98	372±9 n=389
A01	290±8 n=94	281±8 n=94	313±9 n=94	370±9 n=94	313±9 n=376
A64	239±6 n=118	248±7 n=117	285±6 n=117	312±6 n=118	271±7 n=469
A55	267±7 n=112	272±7 n=114	310±8 n=114	350±7 n=114	300±7 n=454
JOVENES	268±4 n=529	272±4 n=534	311±4 n=533	355±4 n=534	301±2 n=2130
A68	311±9 n=96	309±8 n=98	324±9 n=98	414±9 n=98	340±9 n=390
A20	374±11 n=94	419±9 n=95	445±10 n=95	568±13 n=84	451±11 n=368
A67	330±9 n=112	365±9 n=114	412±10 n=114	491±13 n=114	400±10 n=454
A74	356±9 n=109	349±8 n=110	360±8 n=110	426±9 n=110	373±9 n=439
A26	304±8 n=116	303±7 n=116	329±8 n=116	384±10 n=116	330±11 n=464
VIEJOS	334±4 n=527	347±4 n=533	373±4 n=533	451±6 n=522	376±2 n=2115

**TABLA 3R.**-Densidades gliales (**media±ES**) de las diferentes capas corticales (I, II-IV, V y VI) y del total de la corteza frontal en los individuos jóvenes (A7, A57, A1, A64, A55) y viejos (A68, A20, A67, A74, A26). Igualmente se expresan los valores medios obtenidos para cada grupo de edad. Los resultados se expresan en n° de células gliales/ 10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup>). "n" representa el tamaño de la muestra.

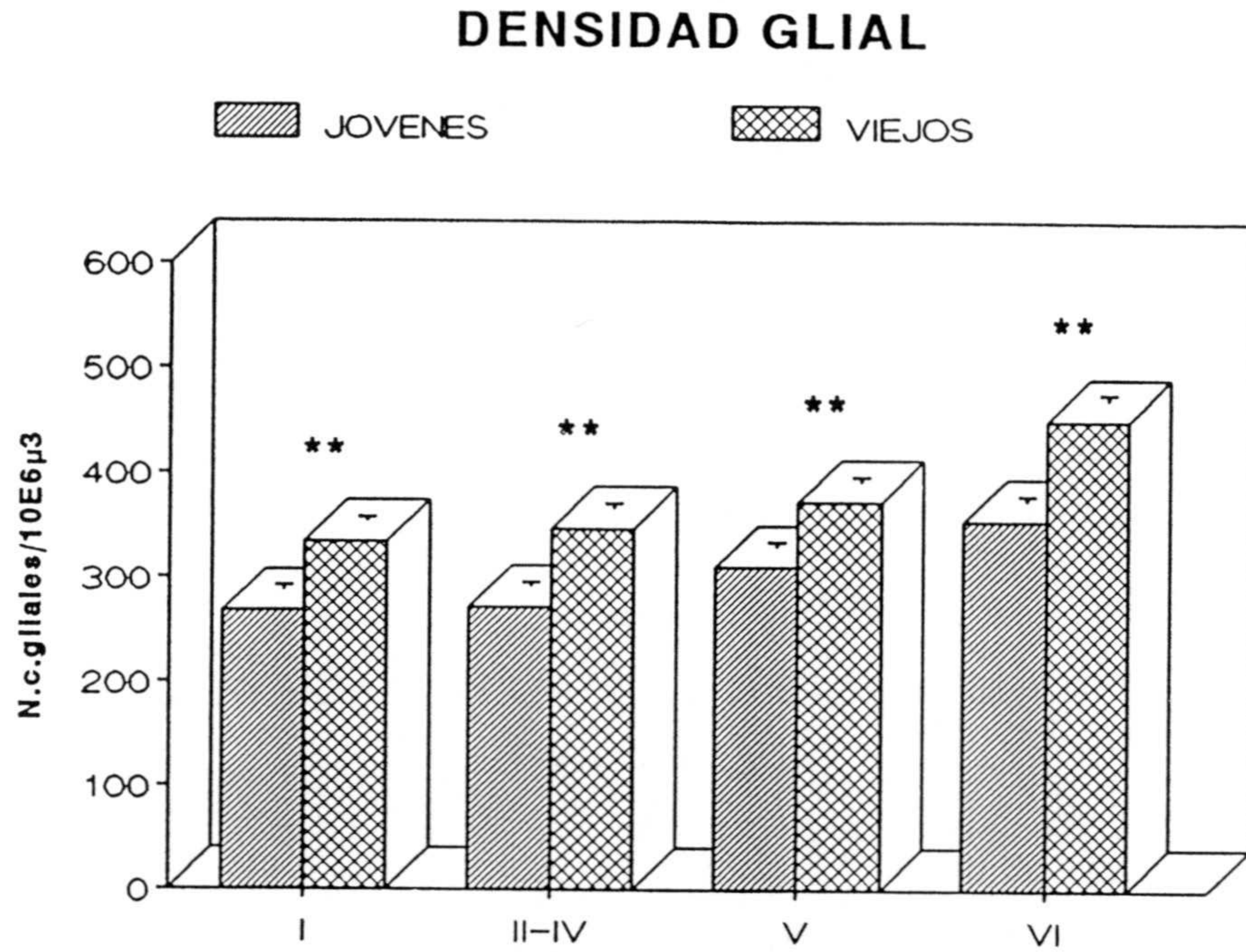


**FIGURA 10R.**- Representación de los valores de densidad glial media para el conjunto de la corteza en los diferentes individuos estudiados. Cada barra muestra la contribución de cada capa (I, II-IV, V y VI) a la totalidad de la corteza. Jóvenes (A38, A57, A1, A64, A55). Viejos (A68, A20, A67, A74, A26).

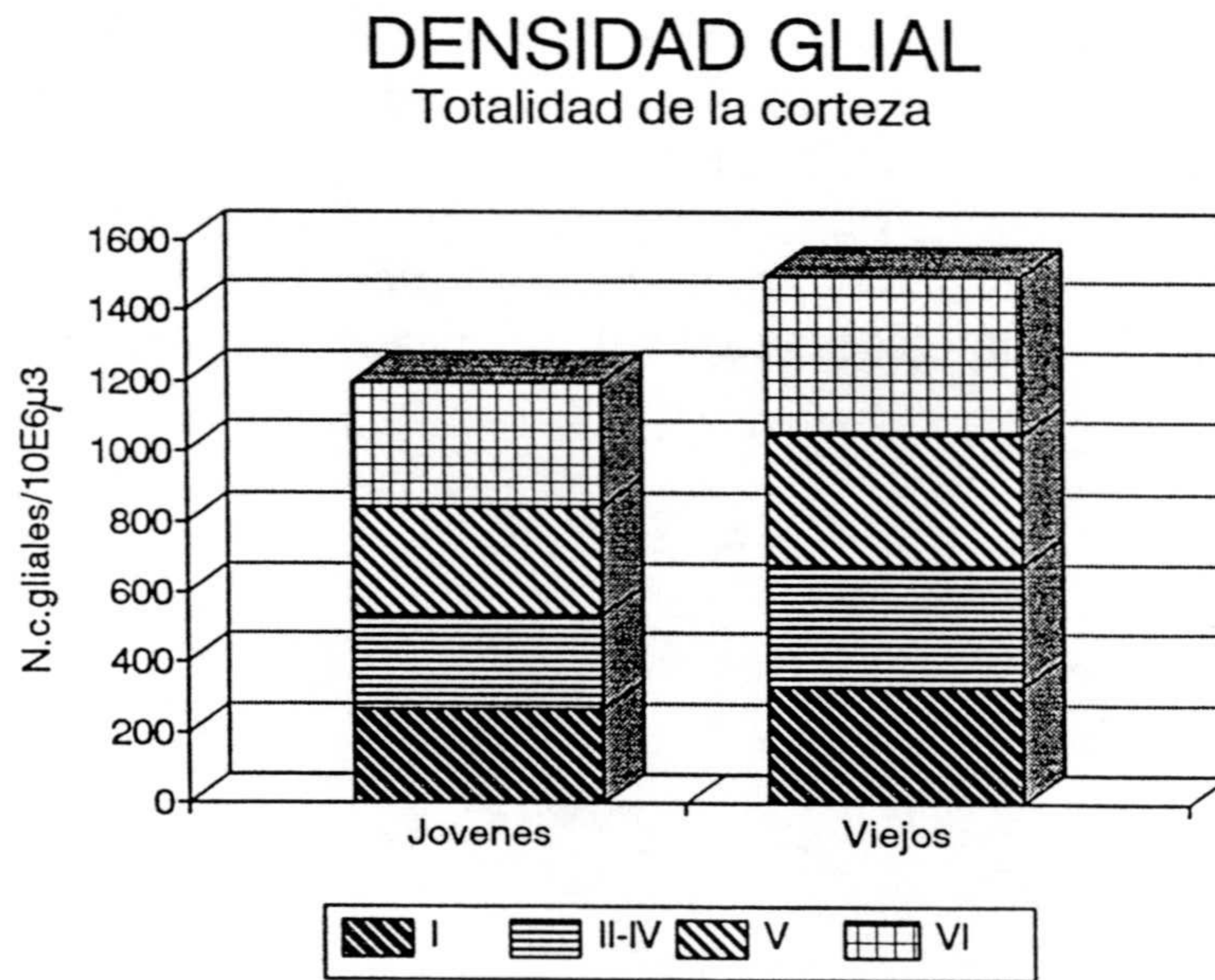


**FIGURA 11R.**-Representación gráfica de los valores medios de densidad glial de cada individuo por el método de intervalos de confianza del 95%. Jóvenes (1:A36; 2:A57; 3:A1; 4:A64; 5:A55). Viejos (6:A68; 7:A20; 8:A67; 9:A74; 10:A26).



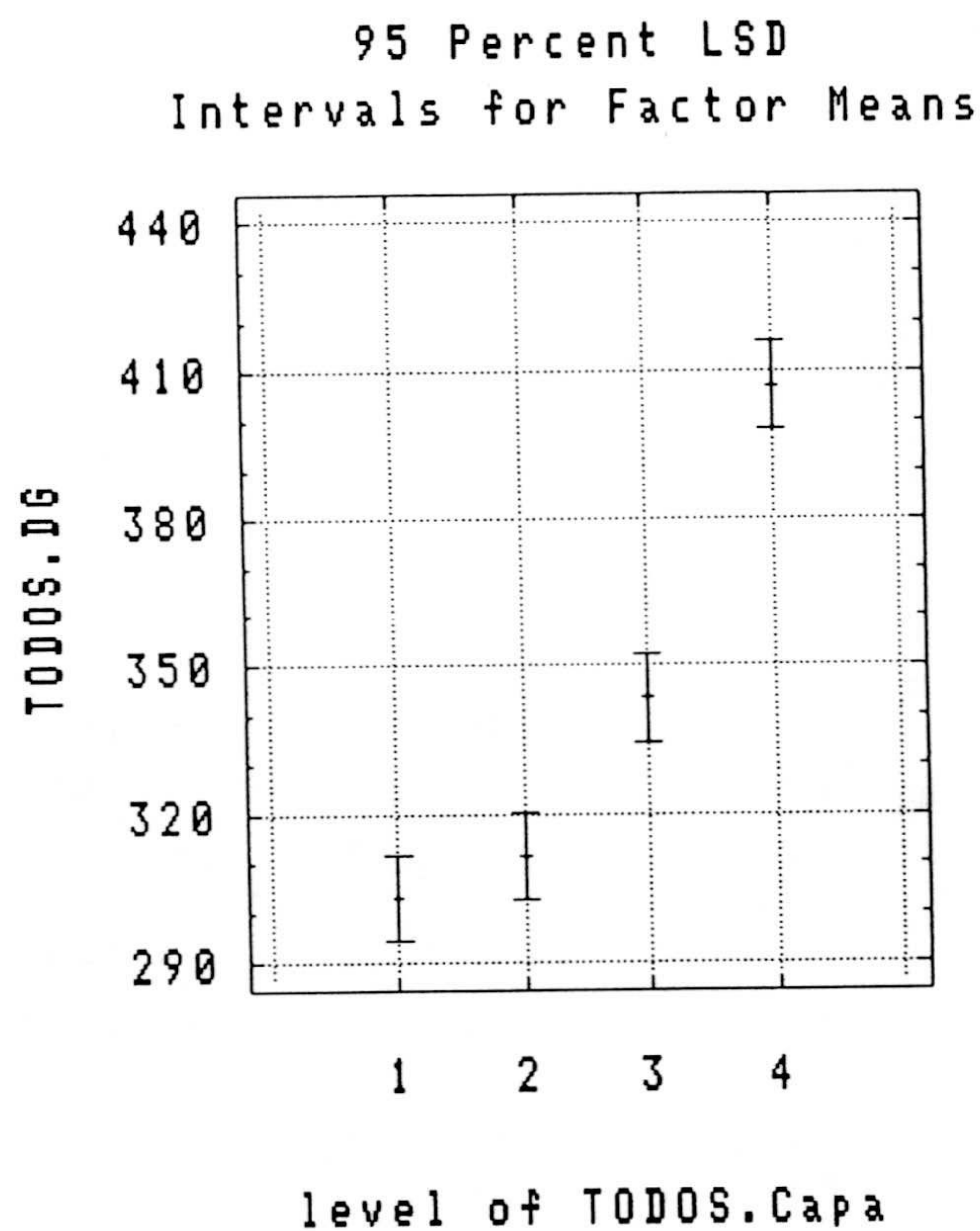


**FIGURA 12R.**- Representación de los valores (media±ES) de densidad glial en en cada una de las capas corticales (I, II-IV, V y VI) de los individuos jóvenes y viejos. Los resultados se expresan en número de células gliales/10<sup>6</sup>µ<sup>3</sup>.



**FIGURA 13R.**- Representación de los valores medios de densidad glial obtenidos para la totalidad de la corteza, en los individuos jóvenes y viejos. Cada barra muestra apiladas las cuotas correspondientes a las diferentes capas corticales (I, II-IV, V y VI).

La densidad glial, al igual que la densidad neuronal e independientemente de la edad, muestra en corteza frontal un patrón común a todos los individuos estudiados, que indica un aumento progresivo de este parámetro desde la capa I a la VI. La ANOVA realizada, tomando como factor discriminante la capa cortical, mostró diferencias significativas entre las diferentes capas en todos los casos estudiados ( $p < 0.01$ ). Realizado el correspondiente test de rango múltiple (Newman-Keuls) clasificó tres grupos respecto a este parámetro. El primero, situado en el rango más bajo, estuvo constituido por las capas I a IV. El segundo, en un rango intermedio, por la capa V. El tercero y último, situado en el rango más elevado, estuvo constituido por la capa VI que presentó los valores más elevados de densidad glial. (Figura 14R).



*FIGURA 14R.-Representación gráfica de los valores medios de densidad glial de cada capa cortical por el método de intervalos de confianza del 95%. (Capas I:1; II-IV:2; V:3; VI:4).*

#### 1.4.SUPERFICIES DEL SOMA Y NUCLEO NEURONAL EN CORTEZA FRONTAL

En las tablas 4R y 5R se muestran los resultados obtenidos para las superficies del soma y núcleo neuronal en cada uno de los diez individuos estudiados. Se detallan los valores correspondientes a las diferentes capas (I, II-IV, V y VI) y al total de la corteza frontal de individuos jóvenes y viejos.

En la figura 15R se representan los valores de superficie del soma (A) y núcleo neuronal (B) en cada uno de los individuos estudiados. Los análisis de varianza realizados, detectaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los diferentes individuos para ambos parámetros. El test de rango multiple realizado confirmó la heterogeneidad existente, incluso entre individuos de la misma edad. Así por ejemplo, el joven A01 presentó valores inferiores a los demás de su edad ( Ver figura 16R A y B).

En la figuras 17R y 18R se representan los valores ( $Media \pm ES$ ) de ambos parámetros para las diferentes capas corticales (I, II-IV, V y VI) (17R) y la totalidad de la corteza frontal (18R) en jóvenes y viejos. Los resultados de los test de comparación efectuados (Mann-Whitney) variaron en función de la capa considerada. En el caso de la superficie del soma neuronal, solo las capas con mayor densidad neuronal y somas más heterogeneos en tamaño (II-IV y VI) presentaron valores significativamente inferiores ( $p < 0.01$ ) en los individuos viejos respecto a los jóvenes. Para la superficie del núcleo neuronal, además de las las capas II-IV y VI ( $p < 0.01$ ), también la capa V (de neuronas con mayor tamaño) presentó valores significativamente menores ( $p < 0.01$ ) en viejos. En la capa I, ambos parámetros fueron similares para los dos grupos de edad. Considerada en su conjunto la totalidad de la corteza, los test realizados también indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre jóvenes y viejos.

	I	II-IV	V	VI	Totales
A38	57.57± 2.89 n=33	95.90± 1.93 n=120	109.54± 3.67 n=121	80.40± 2.05 n=107	85.85± 2.63 n=381
A57	53.53± 1.89 n=33	84.73± 1.61 n=96	115.72± 2.84 n=97	64.97± 1.02 n=97	79.73± 1.84 n=323
A01	46.62± 1.34 n=76	73.4± 1.82 n=116	107.3± 3.48 n=117	54.69± 1.54 n=107	70.5± 2.04 n=416
A64	55.05± 1.56 n=28	82.80± 1.06 n=111	118.2± 2.40 n=113	66.69± 1.10 n=112	80.68± 1.53 n=364
A55	64.96± 1.39 n=62	89.23± 1.52 n=87	125.82± 3.02 n=87	70.8± 1.08 n=87	87.7 1.74 n=323
JOVENES	54.86± 0.90 n=232	84.92± 0.80 n=530	114.77± 1.43 n=535	67.47± 0.74 n=510	80.5± 0.96 n=1807
A68	50.46± 1.90 n=40	87.77± 3.01 n=57	116.43± 4.79 n=55	67.07± 2.24 n=53	80.43± 2.98 n=205
A20	58.58± 1.78 n=28	71.04± 1.03 n=94	100.63± 2.18 n=94	60.37± 1.09 n=83	72.65± 1.52 n=299
A67	55.41± 1.93 n=27	81.06± 1.28 n=113	111.23± 2.56 n=113	68.21± 1.03 n=113	78.97± 1.70 n=366
A74	54.77± 1.78 n=18	78.15± 1.16 n=107	114.33± 2.65 n=109	66.59± 0.84 n=108	78.46± 1.60 n=342
A26	50.46± 1.37 n=68	77.21± 1.56 n=87	115.73± 2.36 n=87	55.33± 1.00 n=87	74.68± 1.57 n=329
VIEJOS	55.98± 0.82 n=181	78.39± 0.69 n=458	111.4± 1.25 n=458	63.61± 0.55 n=444	76.59± 0.82 n=1541

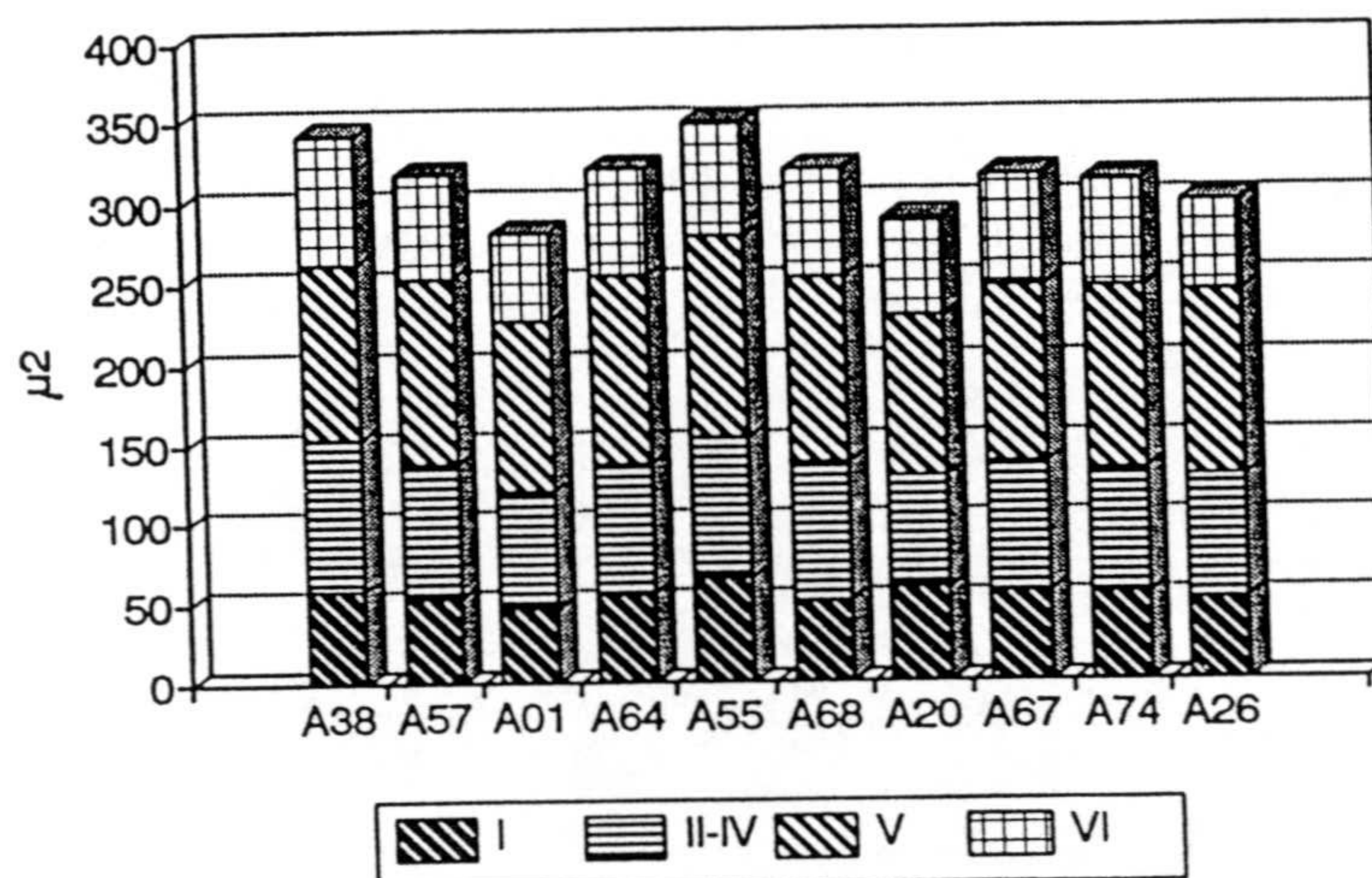
**TABLA 4R.** Superficies del soma neuronal (**media±ES**) de las diferentes capas corticales (I, II-IV, V y VI) y del total de la corteza frontal de los individuos jóvenes (A7, A57, A1, A64, A55) y viejos (A68, A20, A67, A74, A26). Igualmente se expresan los valores medios obtenidos para cada grupo de edad. Los resultados se expresan en  $\mu\text{m}^2$ . "n" representa el tamaño de la muestra.

Resultados

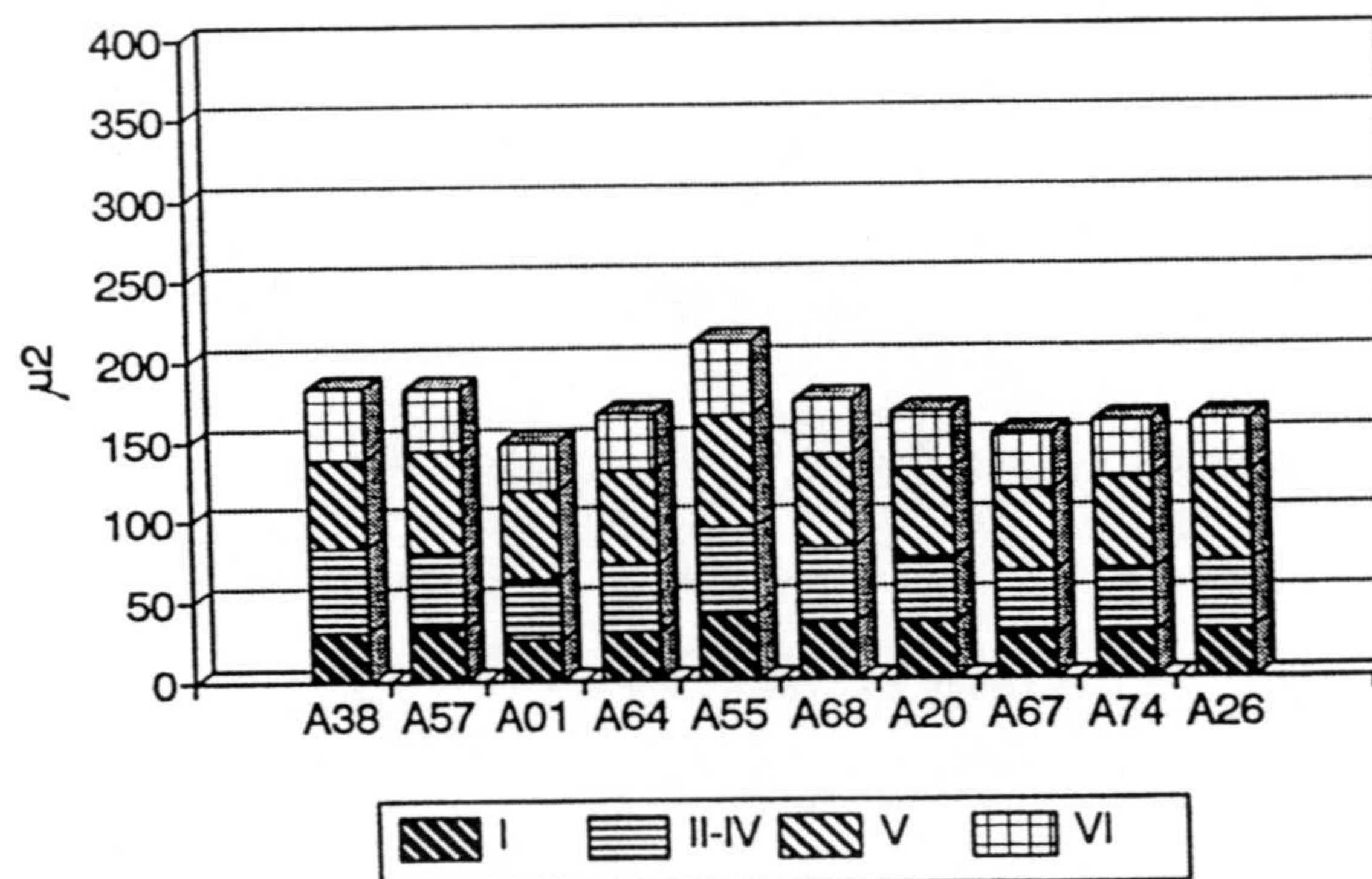
	I	II-IV	V	VI	Totales
A38	30.76± 1.86 n=33	52.50± 1.39 n=120	55.31± 2.14 n=121	44.71± 1.40 n=107	45.82± 1.69 n=381
A57	31.81± 1.43 n=33	49.16± 1.10 n=96	63.55± 1.35 n=97	39.34± 0.67 n=97	45.96± 1.13 n=323
A01	24.87± 0.91 n=76	39.50 1.17 n=116	55.81± 2.25 n=117	30.48± 1.03 n=107	37.66 1.59 n=416
A64	30.39± 1.32 n=28	42.67± 0.63 n=111	58.33± 1.12 n=113	35.75± 0.75 n=111	41.78± 0.95 n=364
A55	40.60± 1.01 n=62	54.42± 0.87 n=87	70.72± 1.53 n=87	45.93 0.79 n=87	52.91 1.05 n=323
JOVENES	31.49± 0.68 n=232	47.30± 0.55 n=530	60.21± 0.84 n=535	38.96± 0.50 n=510	44.49 0.64 n=1807
A68	35.44± 1.33 n=40	47.52± 1.95 n=56	57.86± 3.05 n=55	34.86± 1.49 n=53	42.07± 1.95 n=205
A20	35.44± 1.33 n=28	41± 0.76 n=94	55.93± 1.29 n=94	35.67± 0.79 n=83	42.01± 1.95 n=299
A67	27.44± 1.25 n=27	39.87± 0.70 n=113	52.14± 1.12 n=113	35.03± 0.56 n=113	38.62± 1.01 n=366
A74	28.07± 1.53 n=18	40.41± 0.72 n=107	57.60± 1.15 n=109	36.41± 0.55 n=108	40.62± 0.90 n=342
A26	29.81± 0.93 n=68	42.99± 0.90 n=87	56.73± 1.38 n=87	33.05± 0.68 n=87	40.64± 0.98 n=329
VIEJOS	29.81± 0.58 n=181	41.79± 0.42 n=458	55.68± 0.66 n=458	35.01± 0.33 n=444	40.57± 0.97 n=1541

**TABLA 5R.**-Superficies del núcleo neuronal (**media±ES**) de las diferentes capas corticales (I, II-IV, V y VI) y del total de la corteza frontal en los individuos jóvenes (A7, A57, A1, A64, A55) y viejos (A68, A20, A67, A74, A26). Igualmente se expresan los valores medios obtenidos para cada grupo de edad. Los resultados se expresan en  $\mu\text{m}^2$ . "n" representa el tamaño de la muestra.

### Superficie del soma Grafico A



### Superficie del núcleo Grafico B



**FIGURA 15R.**- Representación de los valores medios de superficie del soma (gráfico A) y núcleo (gráfico B) neuronal, para el conjunto de la corteza en los diferentes individuos estudiados. Cada barra presenta apiladas las cuotas correspondientes a cada capa cortical. Jóvenes (A38, A57, A01, A64, A55). Viejos (A68, A20, A67, A74, A26).

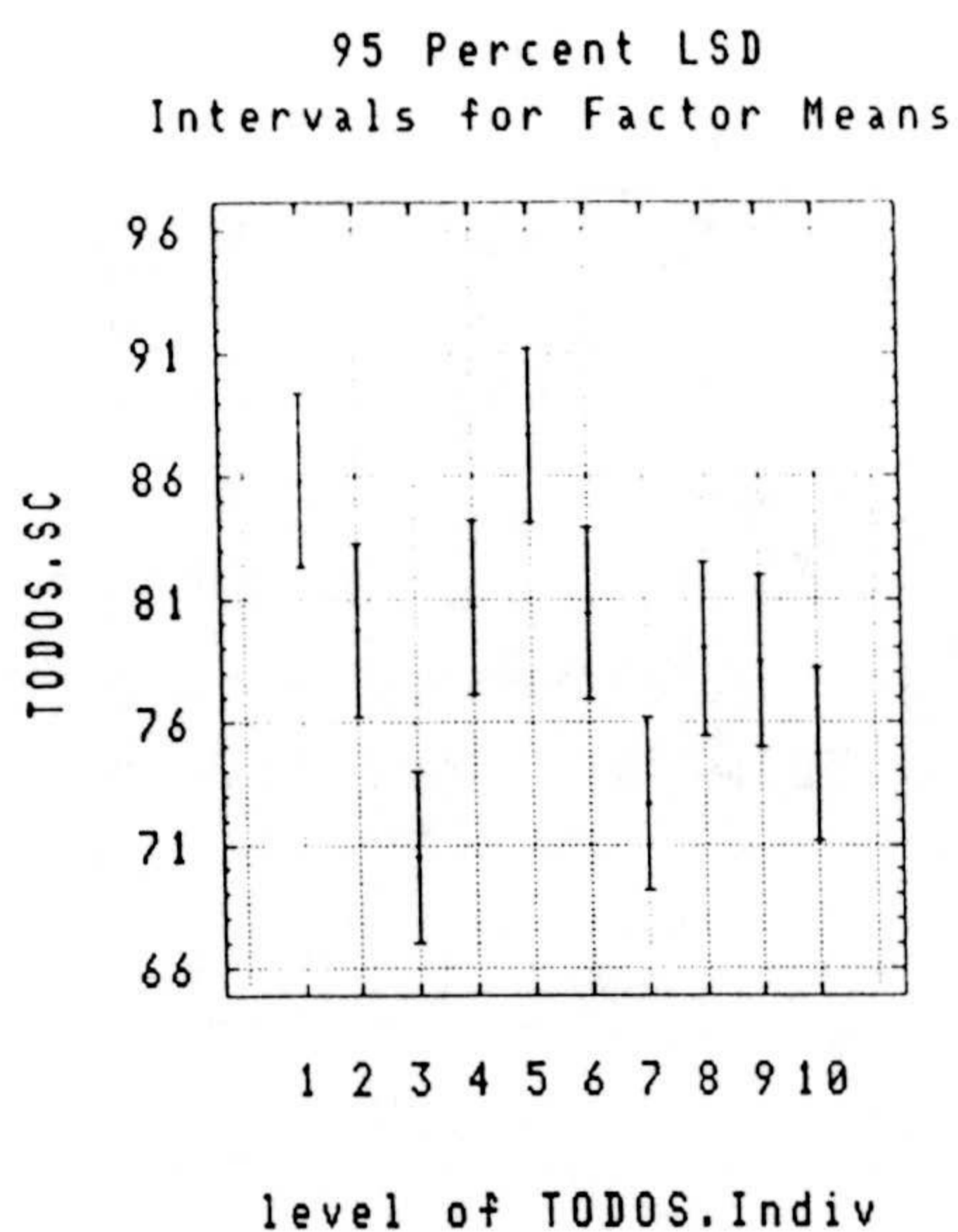


Gráfico A

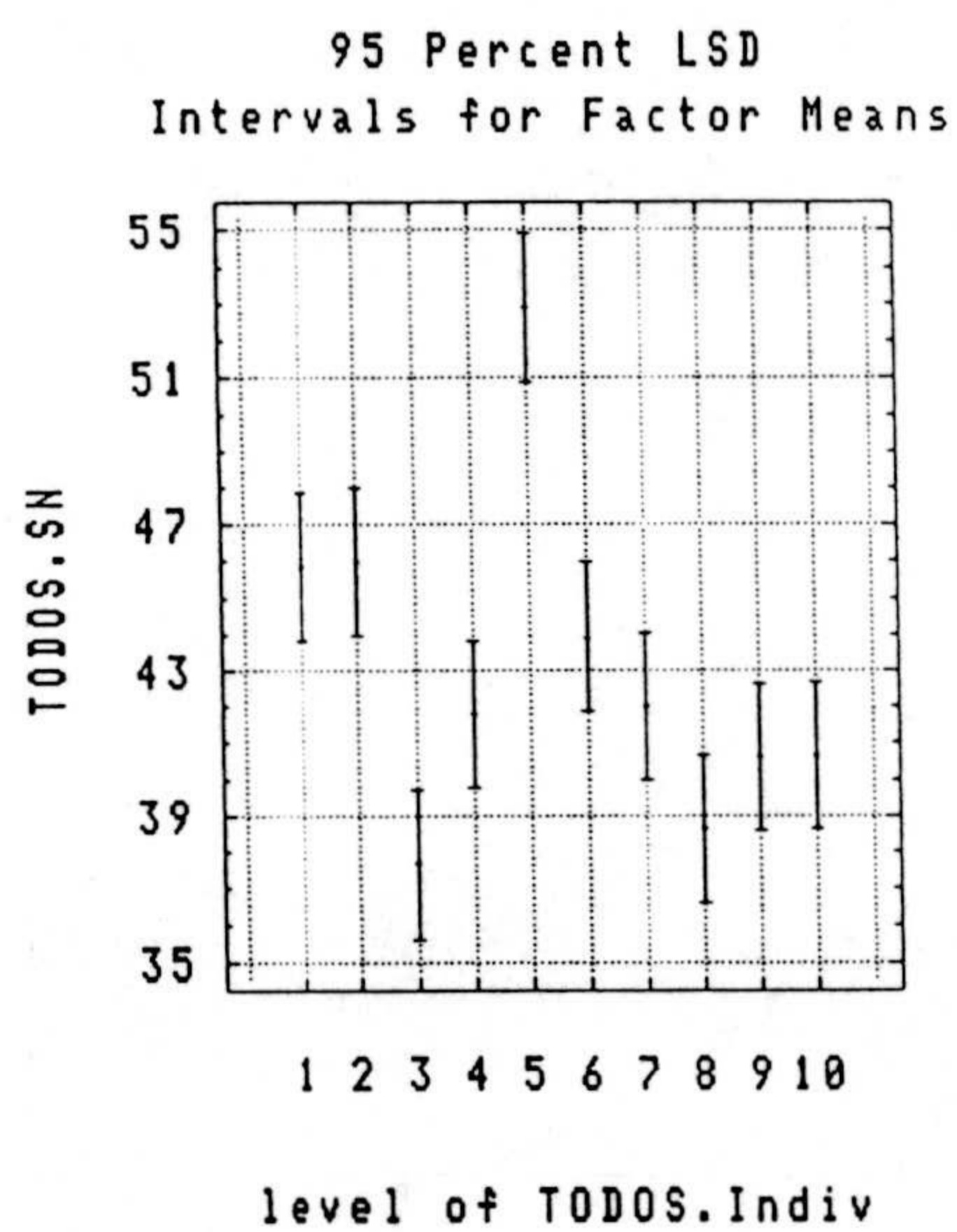
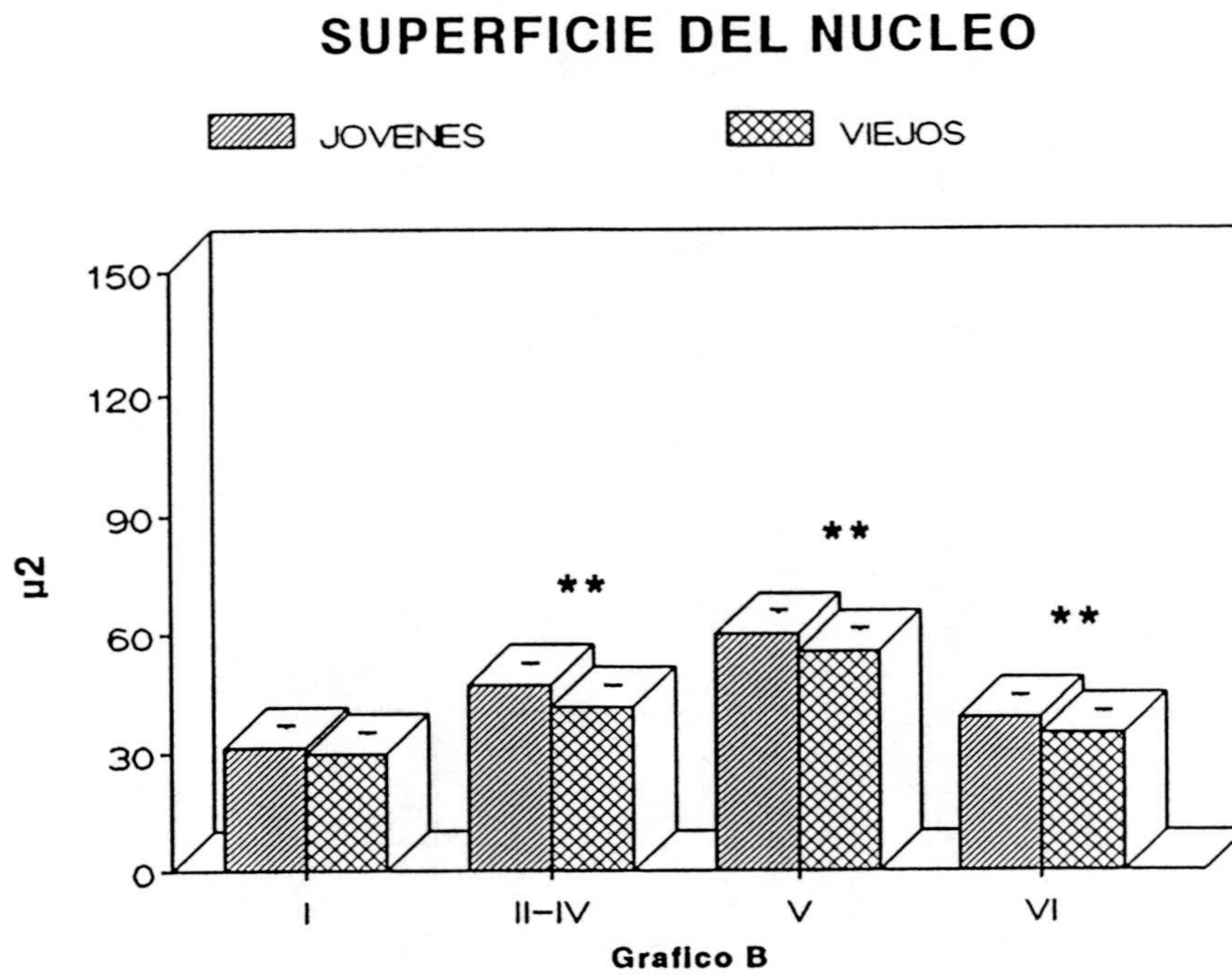
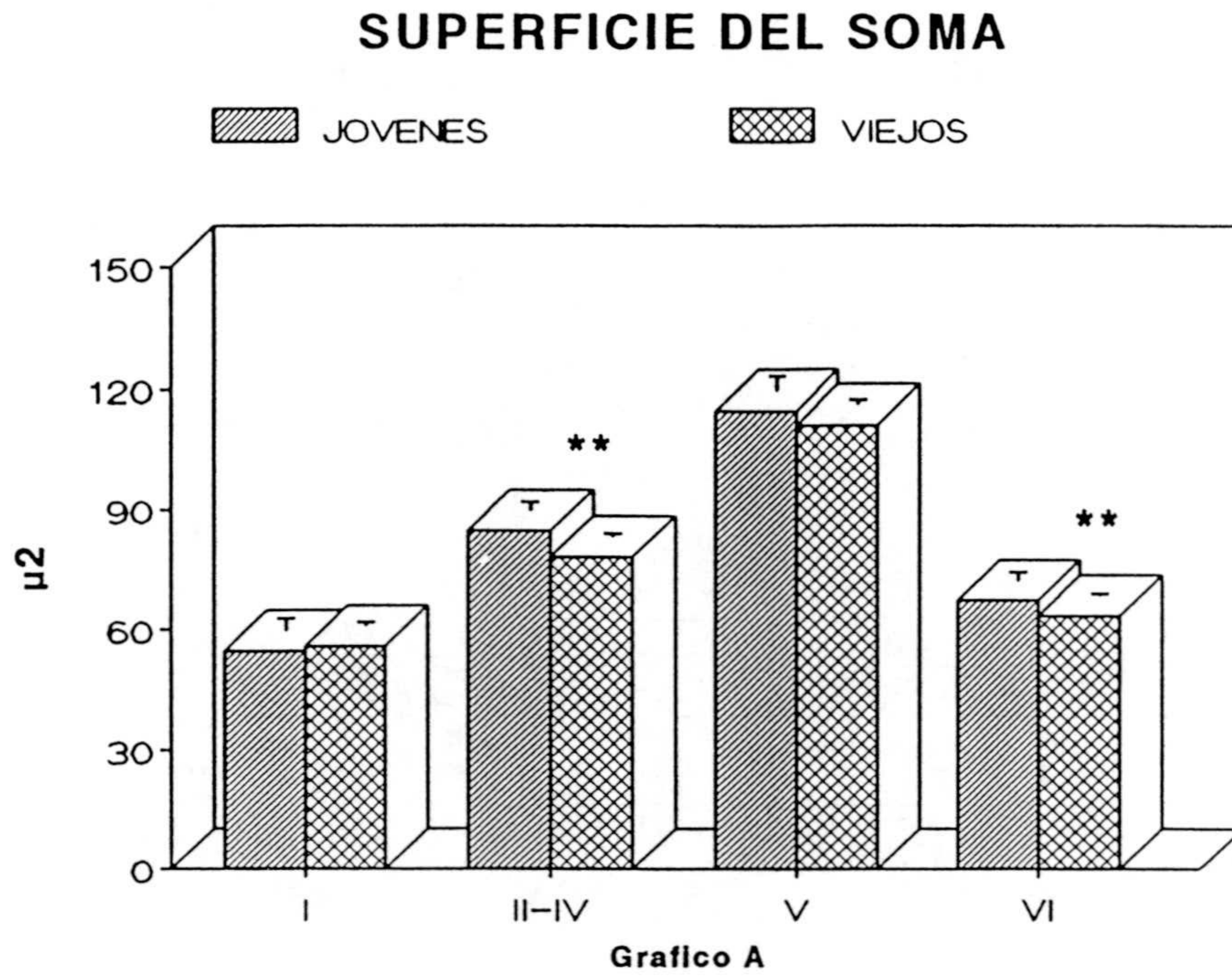


Gráfico B

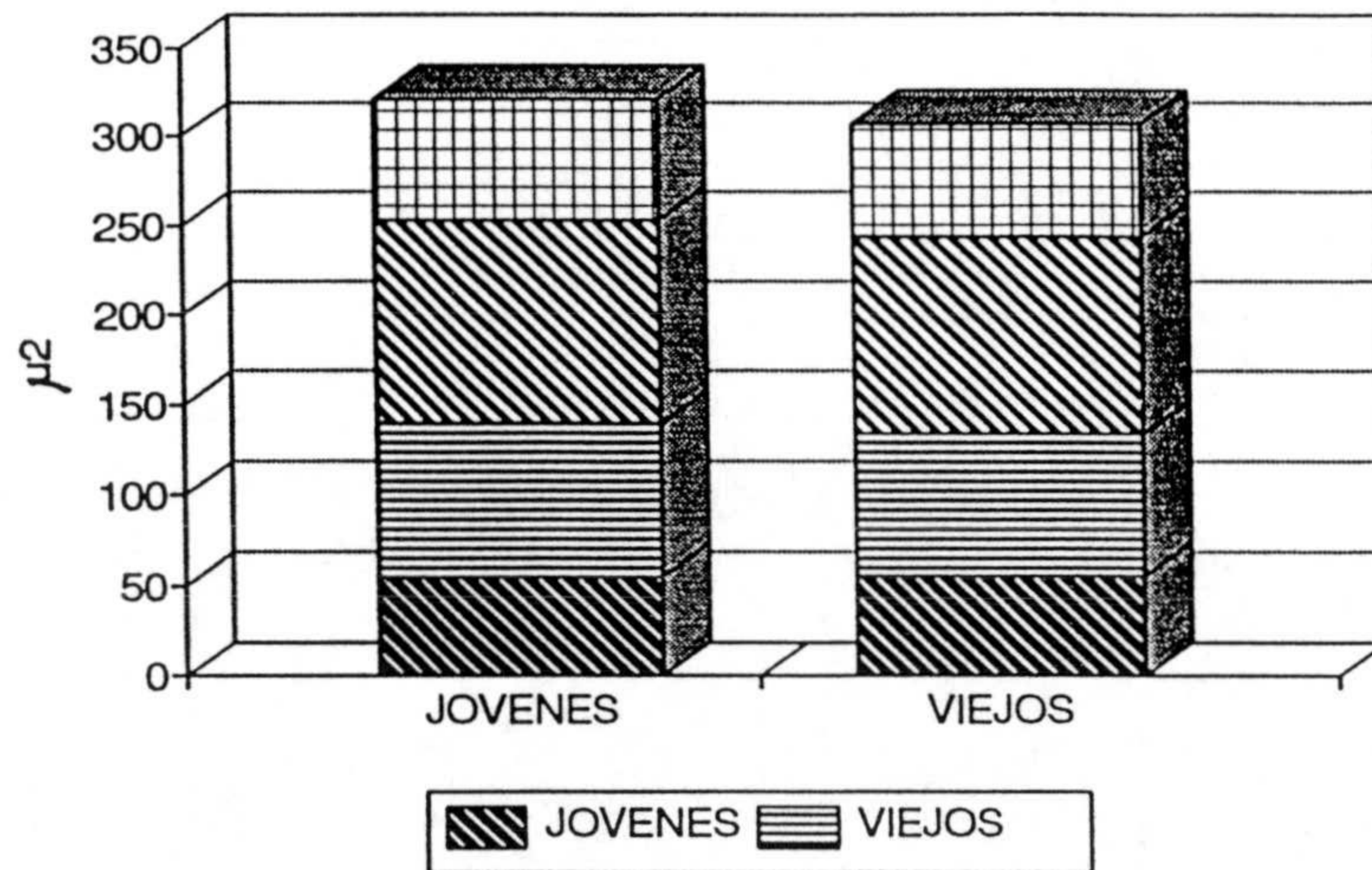
**FIGURA 16R.**- Representación gráfica de los valores medios de superficie del soma (gráfico A) y nucleo neuronal (gráfico B) para cada uno de los individuos incluidos en el estudio por el método de intervalos de confianza del 95%. Jóvenes (1:A38,2:A57, 3:A01, 4:A64, 5:A55). Viejos (6:A68, 7:A20, 8:A67, 9:A74, 10:A26).



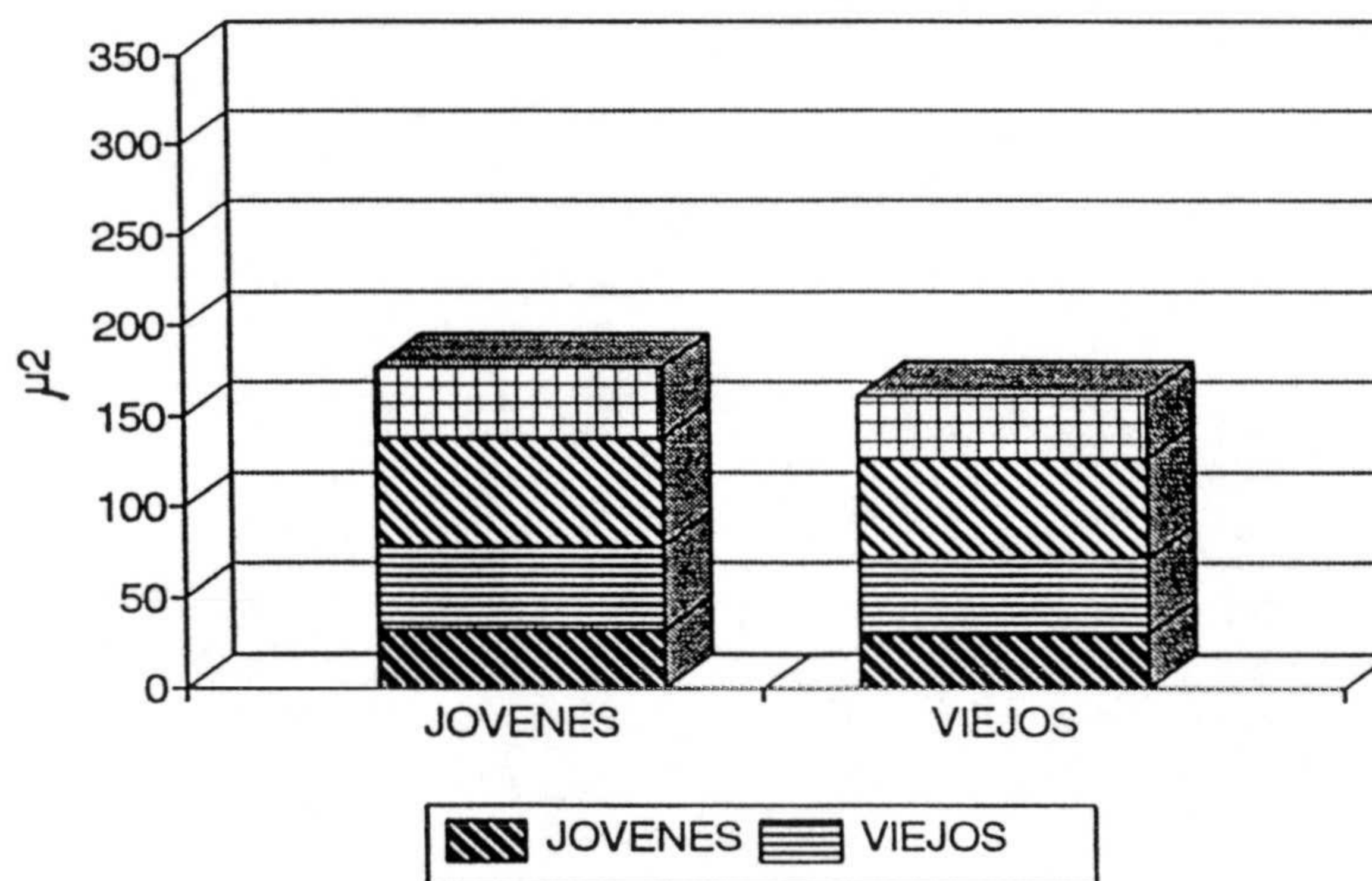


**FIGURA 17R.**-Representación de los valores de superficie media del soma (gráfico A) y núcleo (gráfico B) neuronal en cada una de las capas corticales (I, II-IV, V y VI) de los individuos jóvenes y viejos.

### SUPERFICIE DEL SOMA Grafico A



### SUPERFICIE DEL NUCLEO Grafico B



**FIGURA 18K.**-Representación de los valores medios de superficie del soma (gráfico A) y núcleo (gráfico B) neuronal obtenidos para la totalidad de la corteza en los individuos jóvenes y viejos. Cada barra muestra apilada la cuota correspondiente a los valores de las diferentes capas corticales (I, II-IV, V y VI).

También para las áreas del soma y núcleo neuronal, existe un patrón característico para cada una de las capas corticales. De hecho, la ANOVA efectuada indicó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para ambos parámetros entre las mismas. El test de rango multiple efectuado (Newman-Kewls) tomando como factor discriminante la capa cortical, clasificó las neuronas de todos los individuos estudiados en 4 categorías según la capa cortical, siendo la capa I la que presentó neuronas de menor tamaño (soma de  $54.74 \mu^2$  de superficie), seguida de la VI (soma de  $65.51 \mu^2$  de superficie), la II-IV (soma de  $82,12 \mu^2$  de superficie) y finalmente la V que mostró la neuronas de mayor tamaño ( $113,49 \mu^2$ ). (Ver Figura 19R).

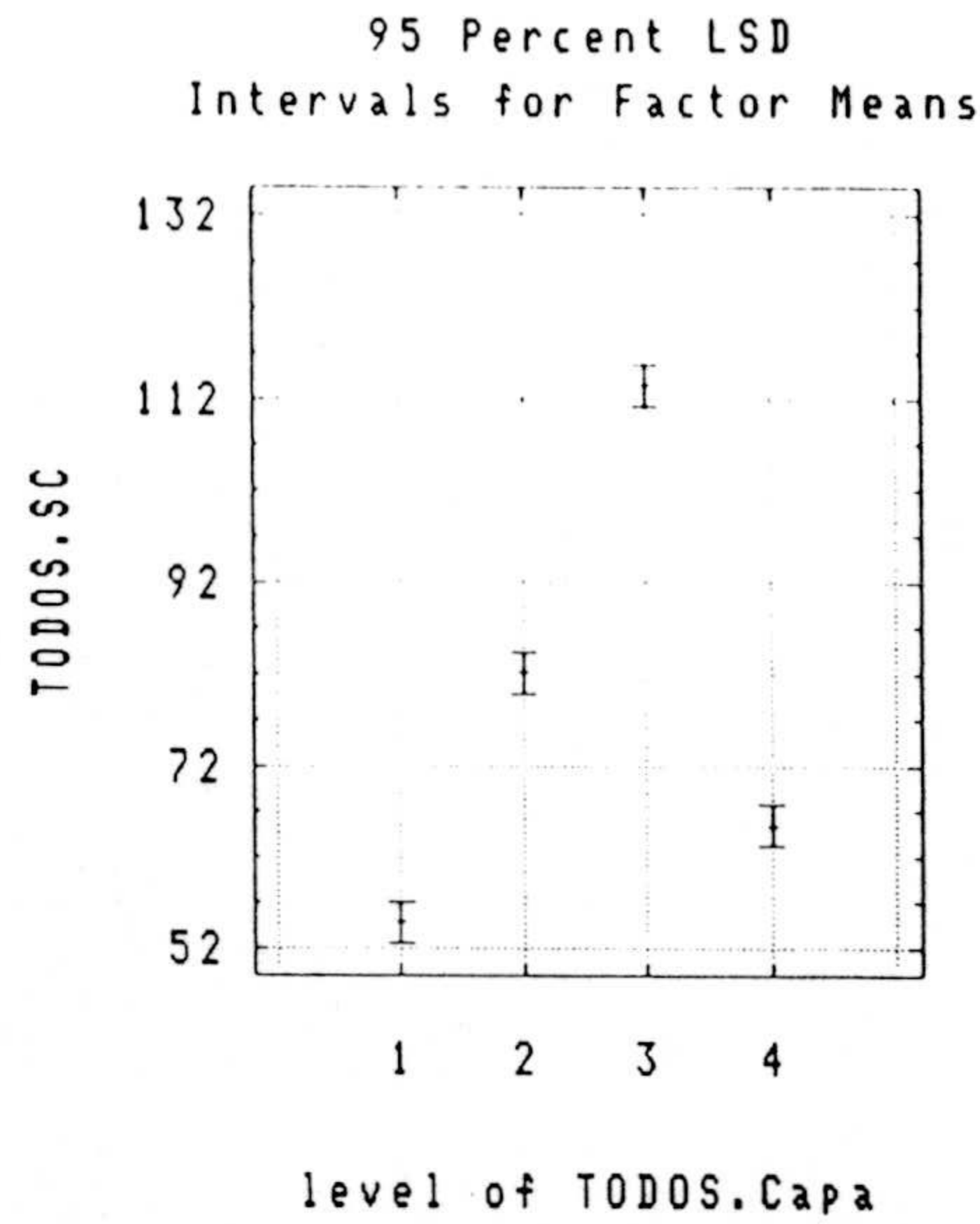


Gráfico A

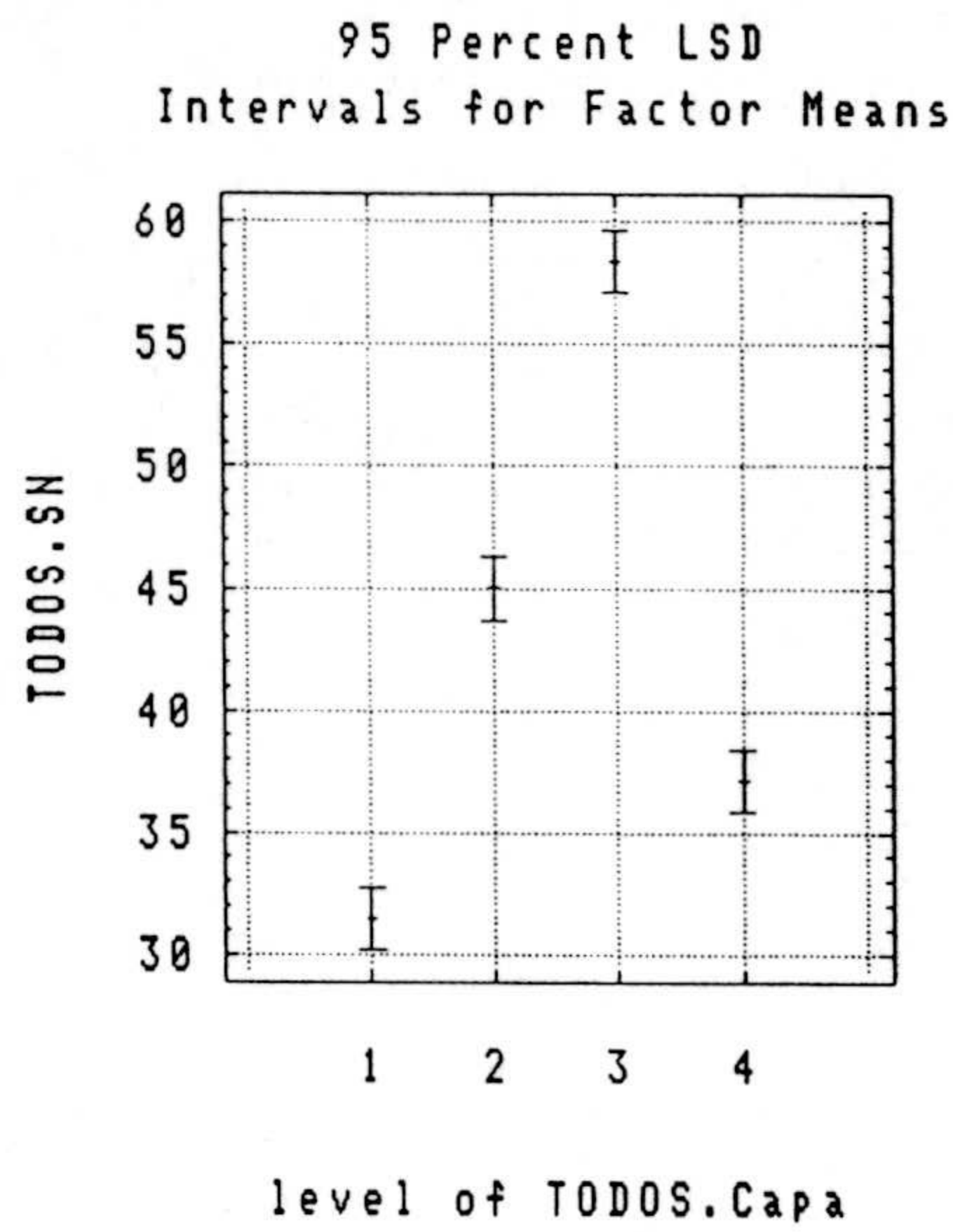


Gráfico B

**FIGURA 19R.**- Representación gráfica de los valores medios de la superficie del soma (gráfico A) y núcleo neuronal (gráfico B) para cada una de las capas corticales incluidas en el estudio por el método de intervalos de confianza del 95%.(Capas 1:I, 2:II-IV, 3:V, 4:VI)

### **1.5.-CORRELACIONES ENTRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS MORFOMETRICOS ESTUDIADOS CON LA TECNICA DEL CRESIL VIOLETA.**

Para llevar a cabo el estudio de las posibles correlaciones existentes, entre los parámetros: volumen cortical, densidad neuronal, densidad glial y superficies del soma y núcleo neuronal, se ha elaborado una matriz de correlación a partir de los valores medios obtenidos para cada uno de ellos, en las 4 capas corticales de los 10 individuos estudiados. Por consiguiente, cada parámetro, en el test de correlación efectuado, representa una variable con 40 datos ordenados según el individuo y la capa cortical.

Se ha utilizado el "test de correlación lineal de Pearson", para establecer el grado de independencia entre todos los parámetros en función de los valores obtenidos para el coeficiente de correlación "r".

La tabla 6R muestra la matriz de correlación efectuada entre los parámetros: volumen de la corteza (Vol), densidad neuronal (DN), densidad glial (DG), superficie de soma neuronal (SC) y superficie del núcleo neuronal (SN).

Cada una de las correlaciones efectuadas presenta tres valores que corresponden al coeficiente de correlación (r), al tamaño de la muestra (n=40) y a la probabilidad (p) de que los parámetros comparados no sean independientes. A valores más elevados de "r" la probabilidad "p" de que sean independientes disminuye por lo que el grado de correlación se incrementa.

En los casos marcados con dos asteriscos la correlación es mayor ( $p < 0.01$ ) que en los marcados con un solo asterisco ( $p < 0.05$ ). Los dos parámetros no están correlacionados en los casos no marcados.

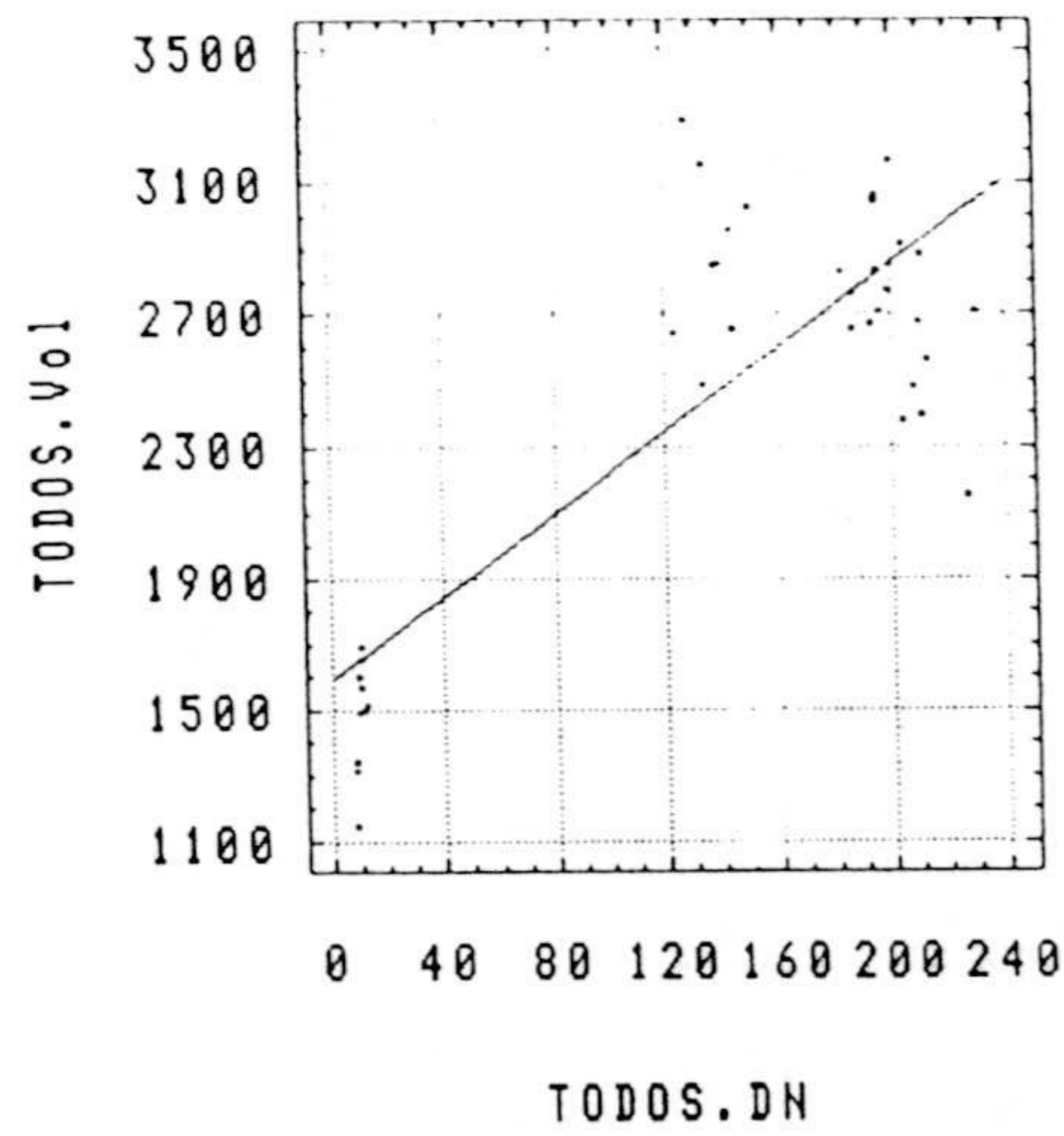
Sample Correlations

	VOL	DN	DG	SC	SN
VOL	1.0000 40 0.0000	.8151 40 .0000 **	.3638 40 .0210 *	.5864 40 .0001 **	.5705 40 .0001 **
DN	.8151 40 .0000 **	1.0000 40 .0000	.2916 40 .0679	.3494 40 .0271 *	.3661 40 .0202 *
DG	.3638 40 .0210 *	.2916 40 .0679	1.0000 40 .0000	-.0925 40 .5702	-.0940 40 .5638
SC	.5864 40 .0001 **	.3494 40 .0271 *	-.0925 40 .5702	1.0000 40 .0000	.9597 40 .0000 **
SN	.5705 40 .0001 **	.3661 40 .0202 *	-.0940 40 .5638	.9597 40 .0000 **	1.0000 40 .0000

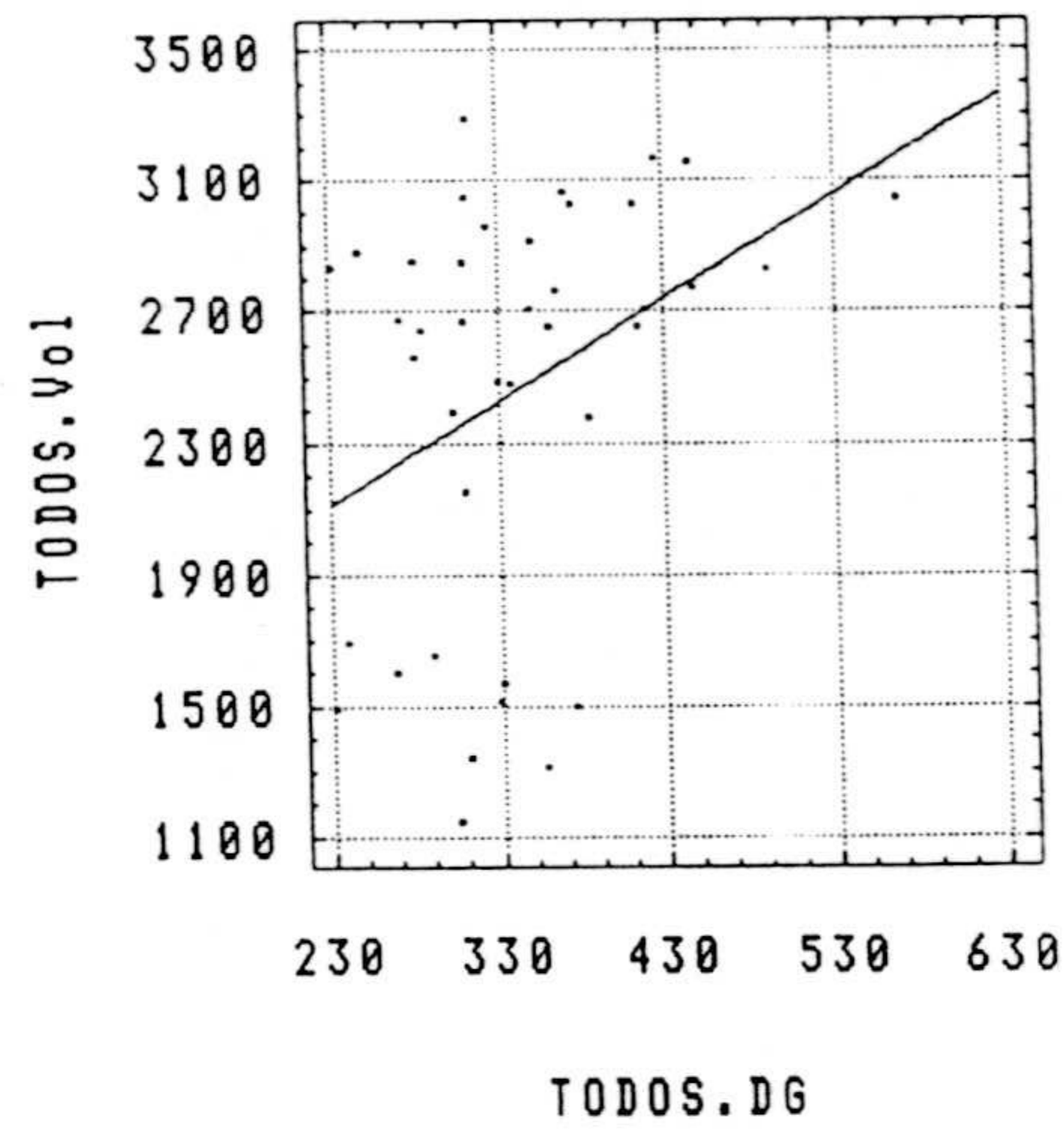
*TABLA 6R.-Matriz de correlación para los diferentes parámetros morfométricos estudiados en corteza frontal con la técnica del cresil violeta.*

Como puede apreciarse el parámetro volumen cortical, está relacionado con todos los demás al 1% ( $p < 0.01$ ) y con la densidad glial al 5% ( $p < 0.05$ ). La densidad neuronal está correlacionada con las superficies del soma y núcleo neuronal. Las superficies del soma y núcleo neuronal están fuertemente correlacionadas entre si. En las figuras 20R, 21R y 22R, se muestran las rectas de regresión correspondientes a los casos que están correlacionados.

Regression of TODOS.Vol on TODOS.DN



Regression of TODOS.Vol on TODOS.DG

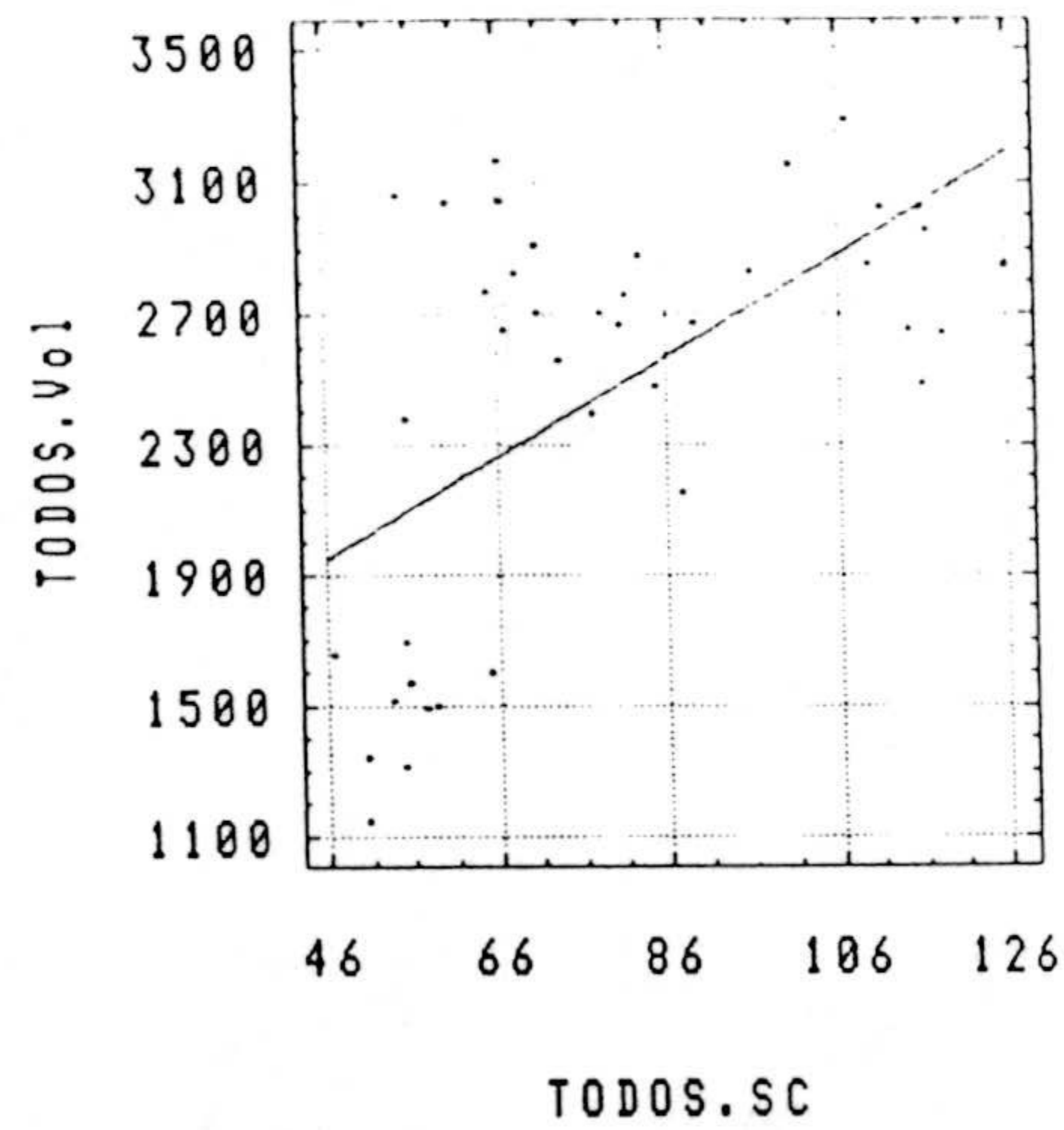


**FIGURA 20R.**-Rectas de regresión correspondientes a las correlaciones entre volumen cortical (VOL) y densidad neuronal (DN) y glial (DG) respectivamente.

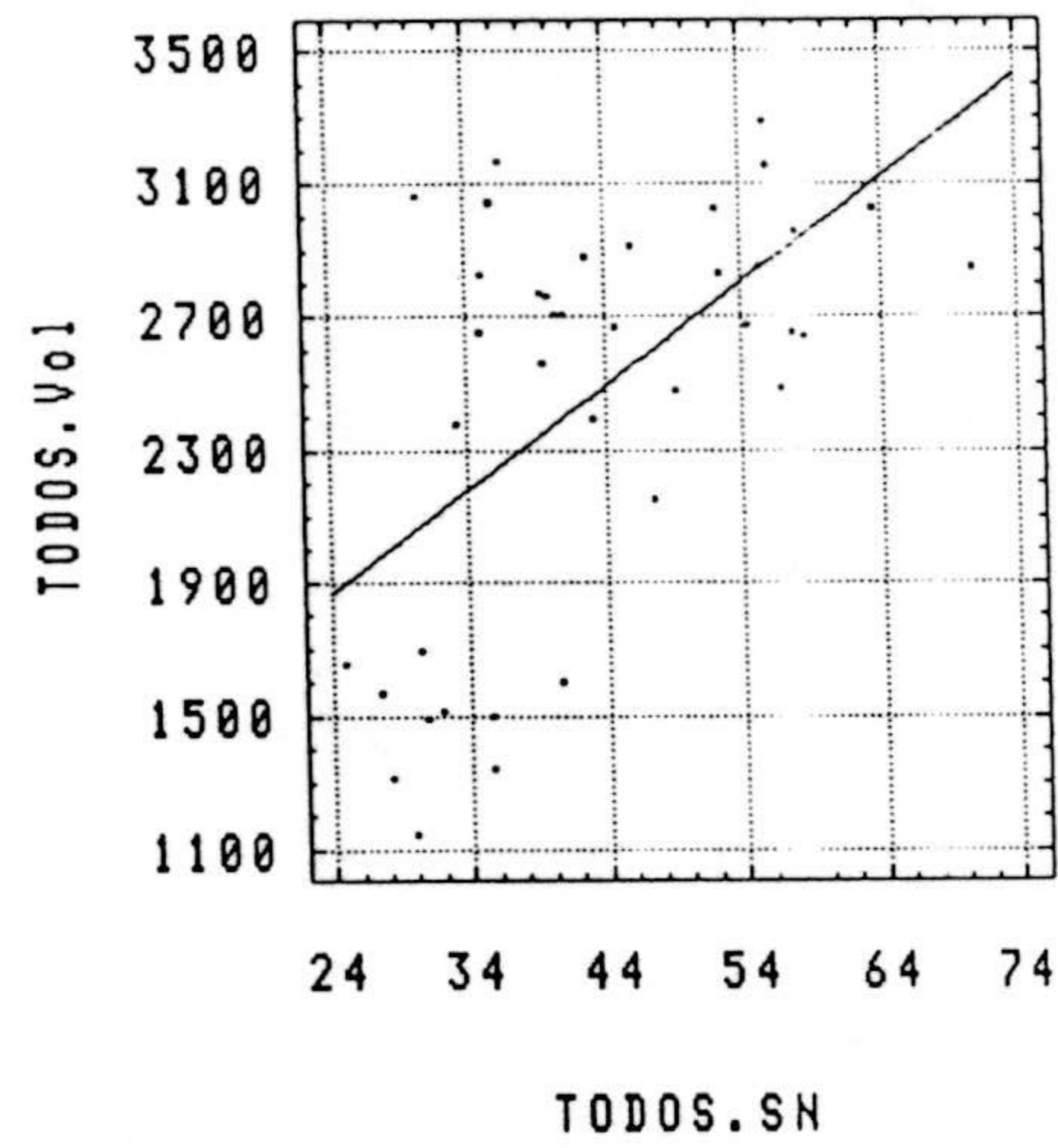
## Resultados

---

Regression of TODOS.Vol on TODOS.SC



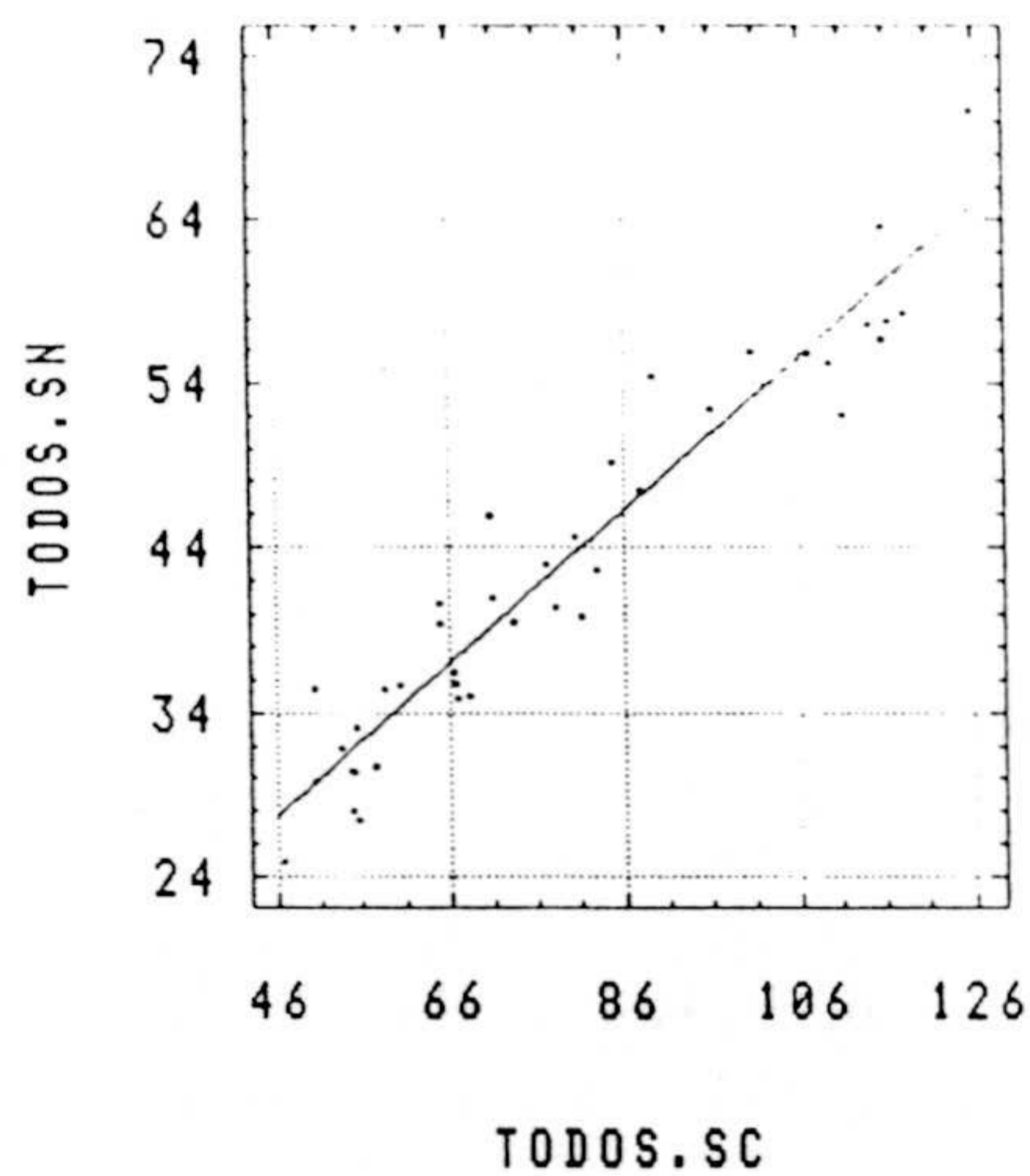
Regression of TODOS.Vol on TODOS.SN



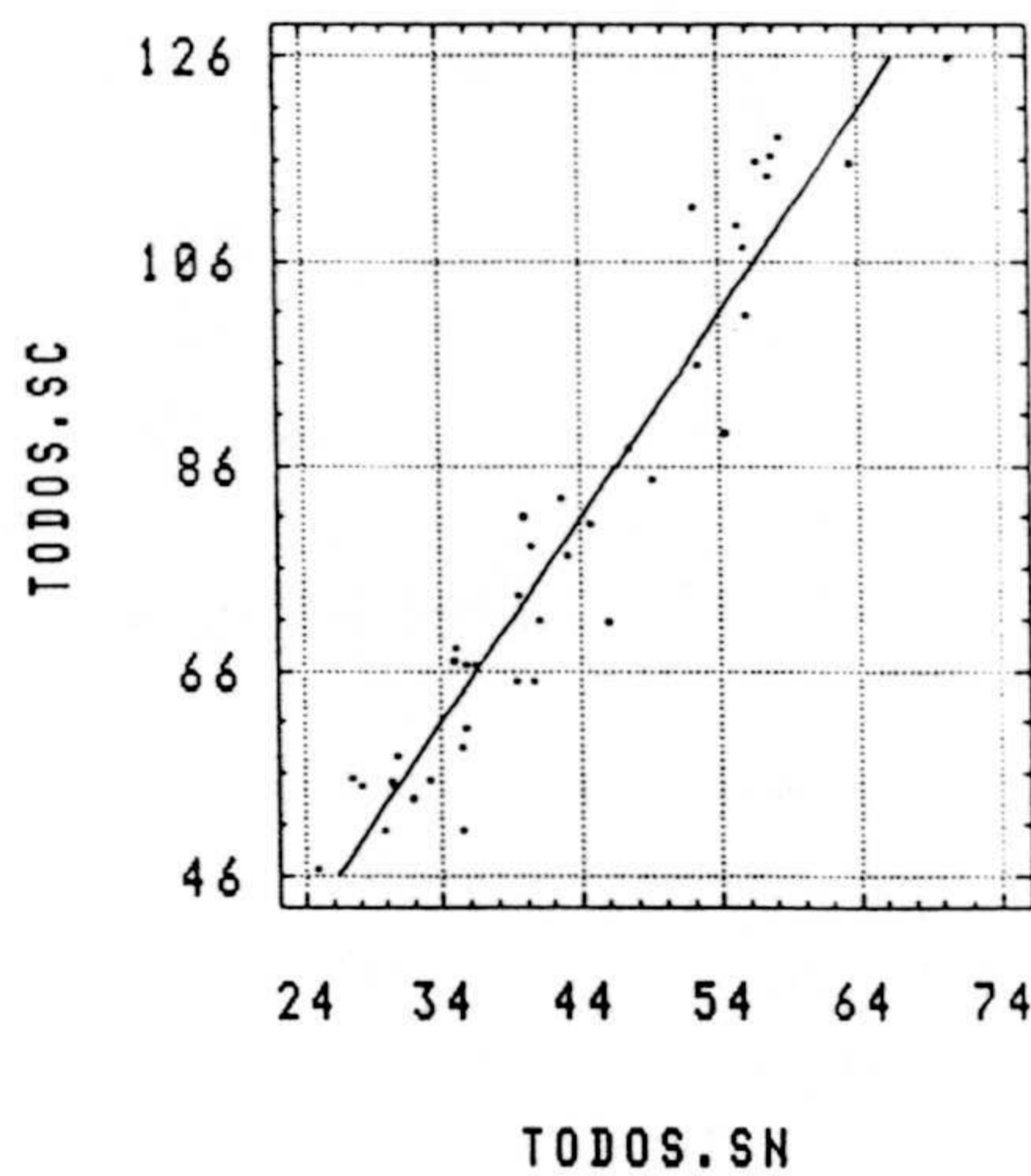
**FIGURA 21R.**-Rectas de regresión correspondientes a las correlaciones entre volumen cortical (VOL) y área del soma (SC) y del núcleo neuronal (SN) (SN) respectivamente.



Regression of TODOS.SN on TODOS.SC



Regression of TODOS.SC on TODOS.SN



*FIGURA 22R.-Rectas de regresión correspondientes a las correlaciones entre área del soma (SC) y núcleo neuronal (SN) y viceversa.*

### **1.6.-DENSIDAD ASTROCITARIA.**

La población astrocitaria, puesta de manifiesto mediante la técnica antiGFAP, ha sido estudiada en seis cerebros, tres jóvenes (J1, J2 y J3) y tres viejos (V1, V2 y V3).

En la tabla 7R se representan los valores de densidad astrocitaria (número de astrocitos por unidad de volumen) en cada uno de los individuos estudiados. Se detallan los resultados obtenidos en los tres niveles corticales (superficial, medio e interno) y en la totalidad de la corteza.

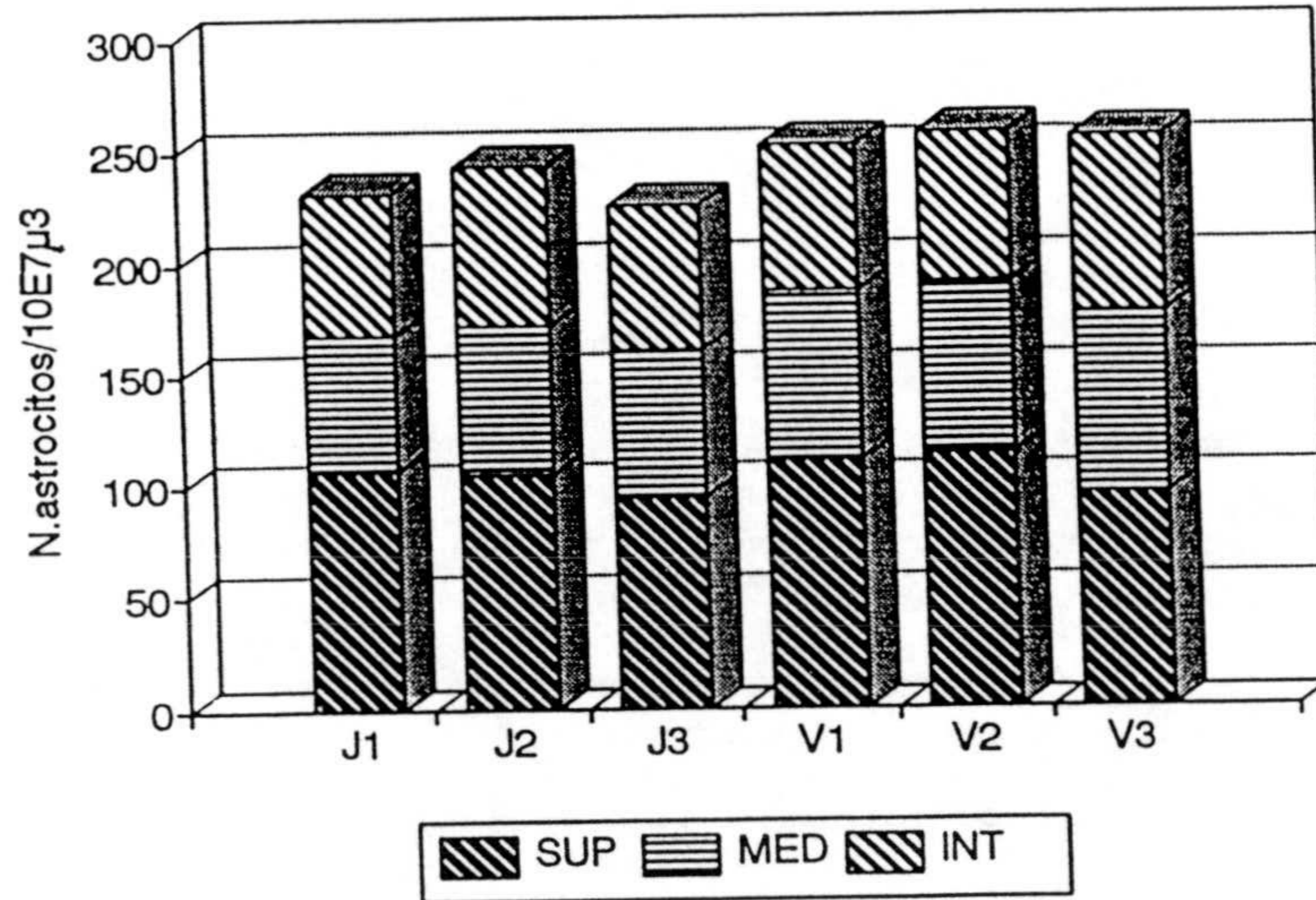
En la figura 23R se representan los valores de densidad astrocitaria ( $Media \pm ES$ ) para cada uno de los individuos estudiados. Como puede apreciarse aunque, los resultados obtenidos resultaron inferiores en los individuos jóvenes, el análisis de varianza realizado no indicó diferencias significativas entre ellos (Ver Figura 24R).

En las figuras 25R y 26R se representan los valores de densidad astrocitaria obtenidos para cada grupo de edad en los tres niveles considerados (25R) y en la totalidad de la corteza (26R). EL tést de comparación efectuado (Mann-Whitney) entre jóvenes y viejos, indicó diferencias significativas a nivel superficial ( $p < 0.05$ ) y medio ( $p < 0.01$ ). También cuando se compararon los valores correspondientes a la totalidad de la corteza se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

	Superficial	Medio	Interno	Total
J1	106±2.2 n=94	62±3.1 n=94	64±3.2 n=94	77± n=282
J2	104±1.6 n=93	68±2 n=93	72±2 n=93	81± n=279
J3	94±1.9 n=75	67±1.8 n=75	65±1.8 n=75	75± n=225
JOVENES	102±1.2 n=262	65±1.5 n=262	67±1.6 n=262	78.1±0.9 n=786
V1	110±1.8 n=91	77±2 n=91	65±2 n=91	84± n=273
V2	113±3 n=81	78±3.1 n=85	67±2.9 n=85	85± n=251
V3	95±1.6 n=81	82±1.6 n=81	79±1.6 n=81	85± n=243
VIEJOS	106±1.3 n=253	79±1.3 n=257	70±1.3 n=257	85±0.9 n=767

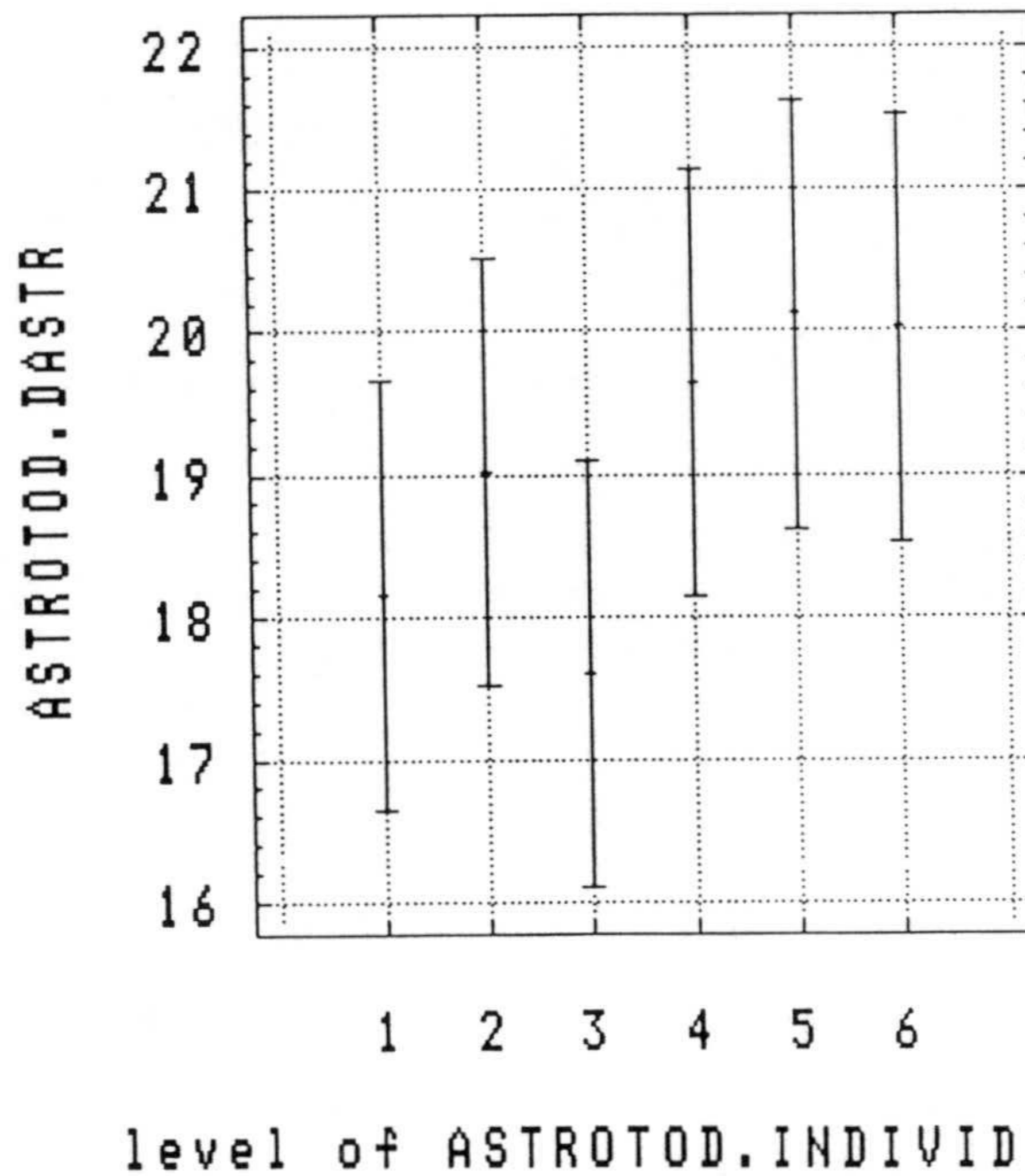
**TABLA 7R.** -Densidad media de astrocitos (**media±ES**) en los diferentes niveles corticales (superficial, medio e interno) y en la totalidad de la corteza de los individuos jóvenes (J1, J2, J3) y viejos (V1, V2, V3). Igualmente se expresan los valores medios obtenidos para cada grupo de edad. Los resultados se expresan como número de astrocitos /10<sup>7</sup> μ<sup>3</sup>. "n" representa el tamaño de la muestra.

### DENSIDAD ASTROGLIAL

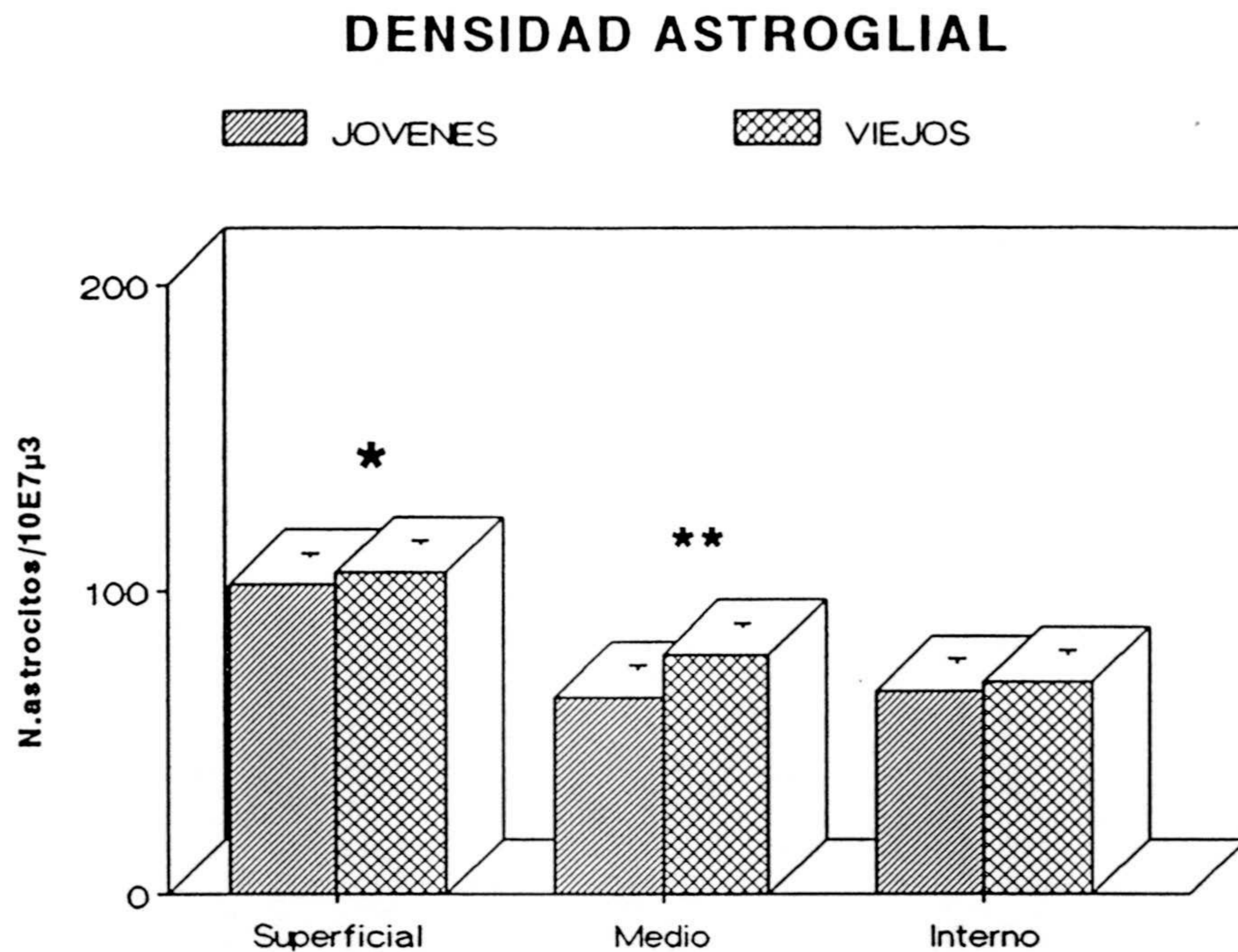


**FIGURA 23R.**-Representación de los valores medios de densidad astroglial para el conjunto de la corteza en los diferentes individuos estudiados. Cada barra muestra la contribución de los tres niveles considerados (superficial, medio e interno) a la totalidad de la corteza.

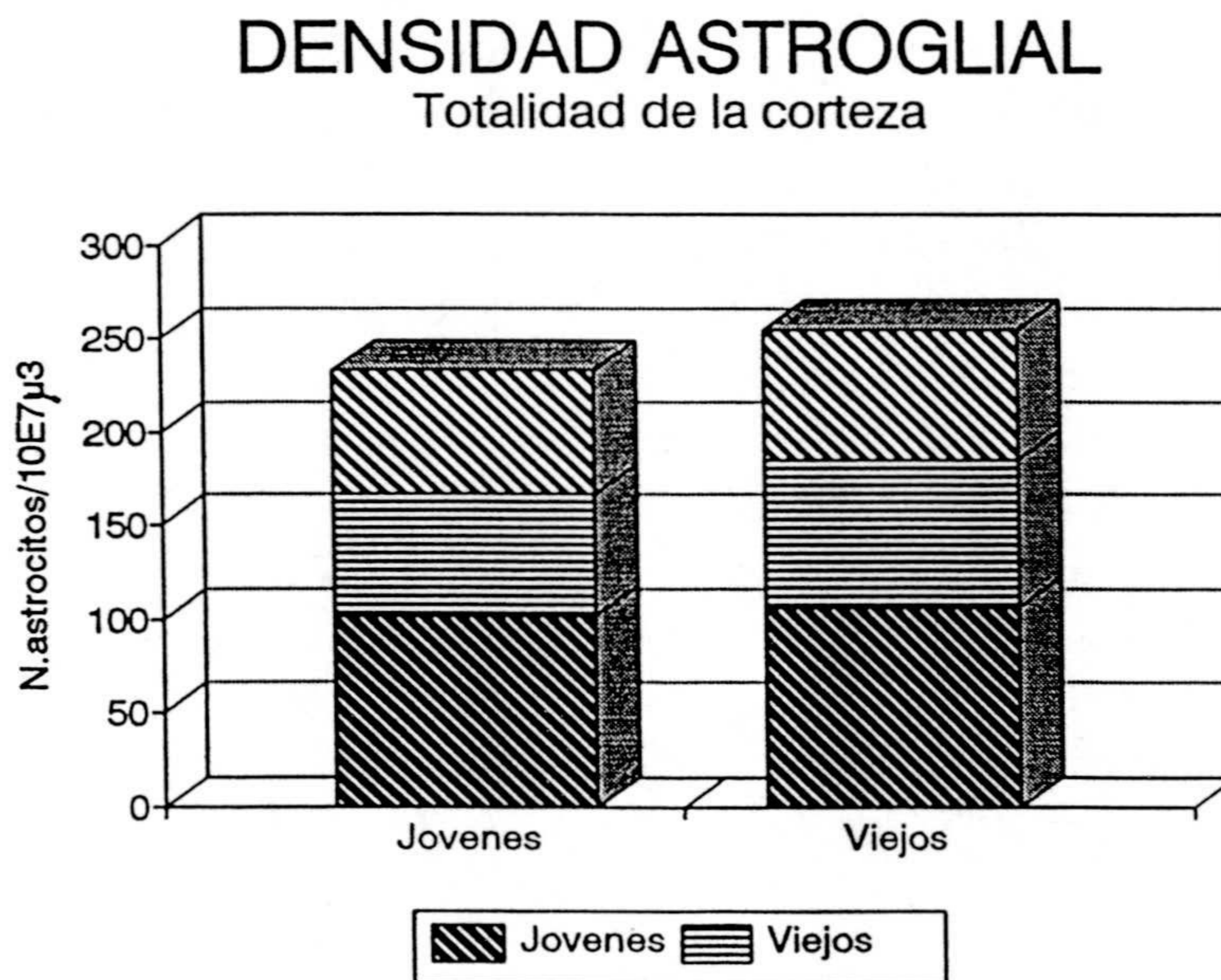
### Intervals for Factor Means



**FIGURA 24R.**-Representación gráfica de los valores medios de densidad astroglial de cada individuo por el método de intervalos de confianza del 95%. Jóvenes (1:J1; 2:J2; 3:J3). Viejos (4:V1; 5:V2; 6:V3).

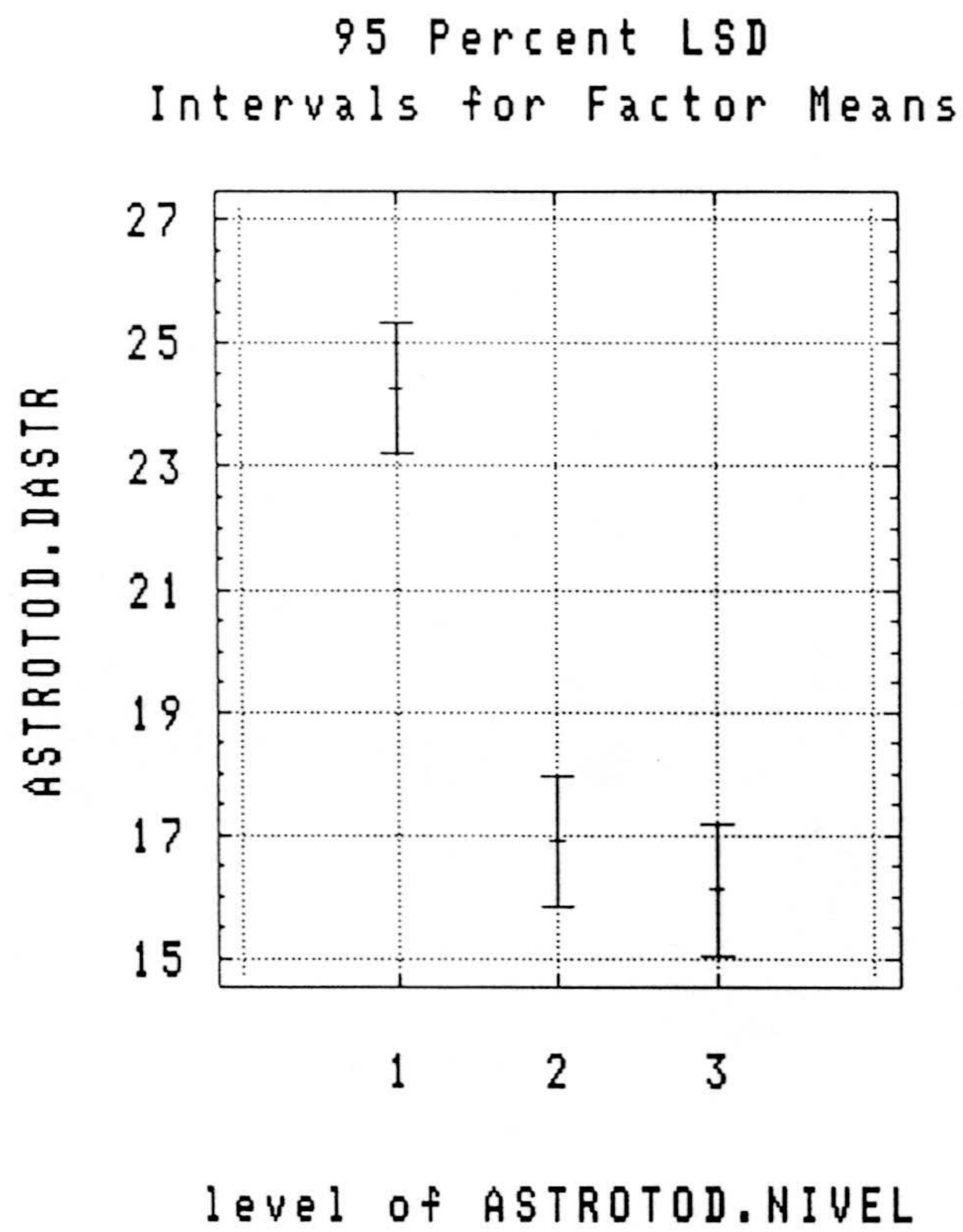


**FIGURA 25R.** Representación de los valores de densidad astroglial (mediaES) en cada uno de los niveles corticales (superficial, medio e interno) de los individuos jóvenes (J1, J2, J3) y viejos (V1, V2, V3). Los resultados se expresan en número de astrocitos /10<sup>7</sup> µ3.



**FIGURA 26R.-** Representación de los niveles de densidad astroglial obtenidos para la totalidad de la corteza en los individuos jóvenes y viejos. Cada barra muestra apilada la contribución de cada nivel (superficial, medio e interno) a la totalidad de la corteza.

La densidad astrogial, presenta también un patrón característico para los niveles corticales considerados común a todos los individuos estudiados. Los valores más elevados se detectan a nivel superficial; en regiones más profundas de la corteza el número de astrocitos disminuye. De hecho, la ANOVA realizada indicó diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre los tres niveles corticales. El test de rango múltiple (Newman-Keuls) efectuado, tomando como elemento discriminante el nivel cortical, consideró dos grupos respecto a este parámetro, uno correspondiente al nivel superficial y otro al medio e interno. (Figura 27R). Posiblemente, la mayor concentración de astrocitos a nivel superficial sea consecuencia de la necesidad de constituir la membrana subpial superficial.



*FIGURA 27R.- Representación gráfica de los valores medios de densidad astrogliol de cada nivel cortical por el método de intervalos de confianza del 95%. (Niveles 1:Superficial; 2:Medio; 3:Interno).*





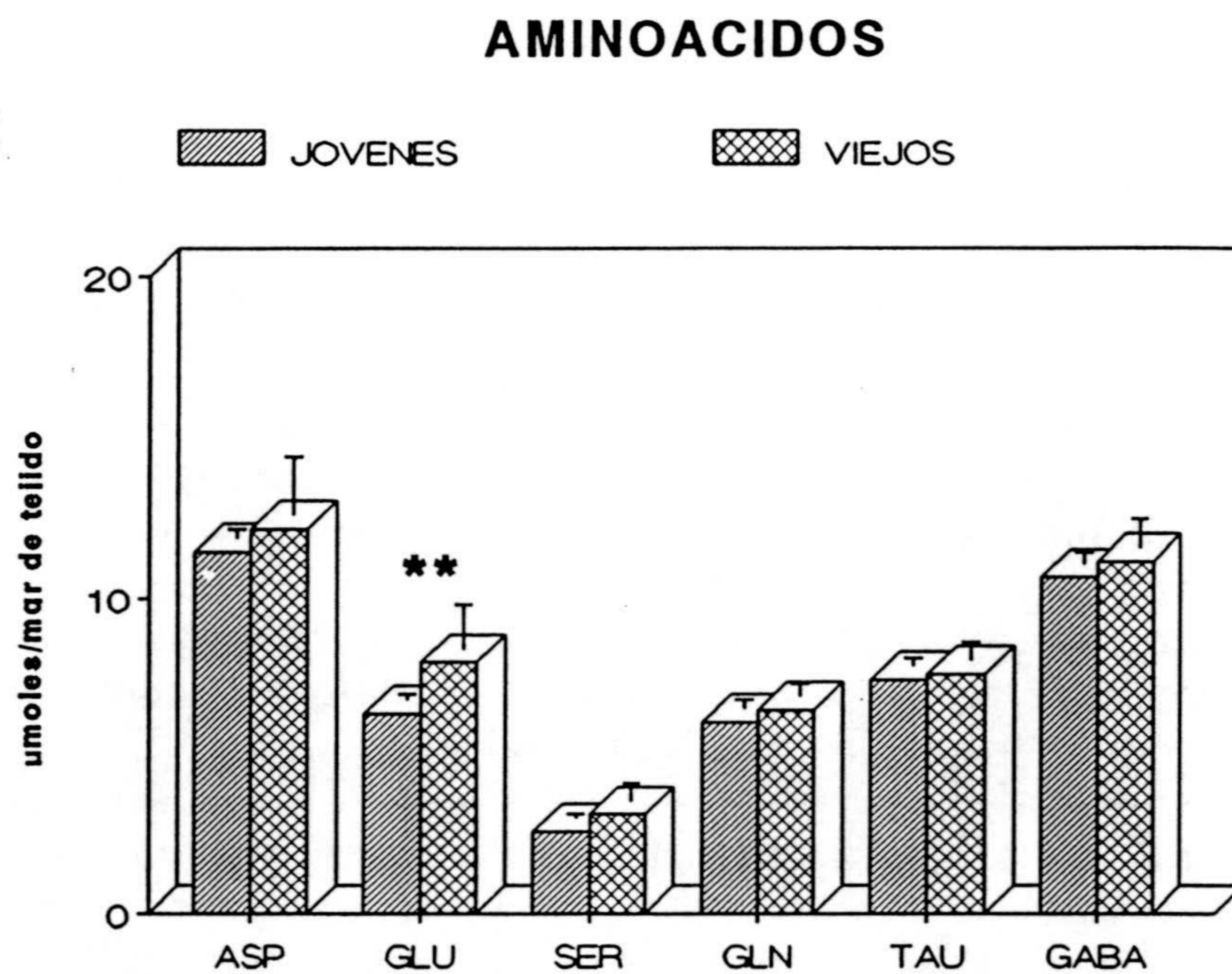
## 2.-RESULTADOS NEUROQUIMICOS

Se relacionan los resultados obtenidos del análisis de los aminoácidos aspártico (Asp), glutámico (Glu), serina (Ser), glutamina (Gln), taurina (Tau) y ácido  $\tau$ -aminobutírico (GABA) así como de la actividad de la alanilaminopeptidasa (AlaAp),  $\alpha$ -glutamylaminopeptidasa ( $\alpha$ GluAp), piro-glutamylaminopeptidasa (pGluAp) y aspartilaminopeptidasa (AspAp), en la corteza frontal de ratas jóvenes y viejas.

## **2.1.-EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS EN CORTEZA FRONTAL.**

En este apartado se muestran los niveles obtenidos (en  $\mu\text{moles/mg.}$  de tejido) para los aminoácidos ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), glutamina (Gln), taurina (Tau) y ácido  $\tau$ -aminobutírico (GABA).

El análisis estadístico (tést de Mann-Whitney), muestra un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en los niveles de Glu en la corteza frontal de animales viejos respecto a los encontrados en animales jóvenes. El resto de aminoácidos estudiados no mostró diferencias significativas (Figura 28R).



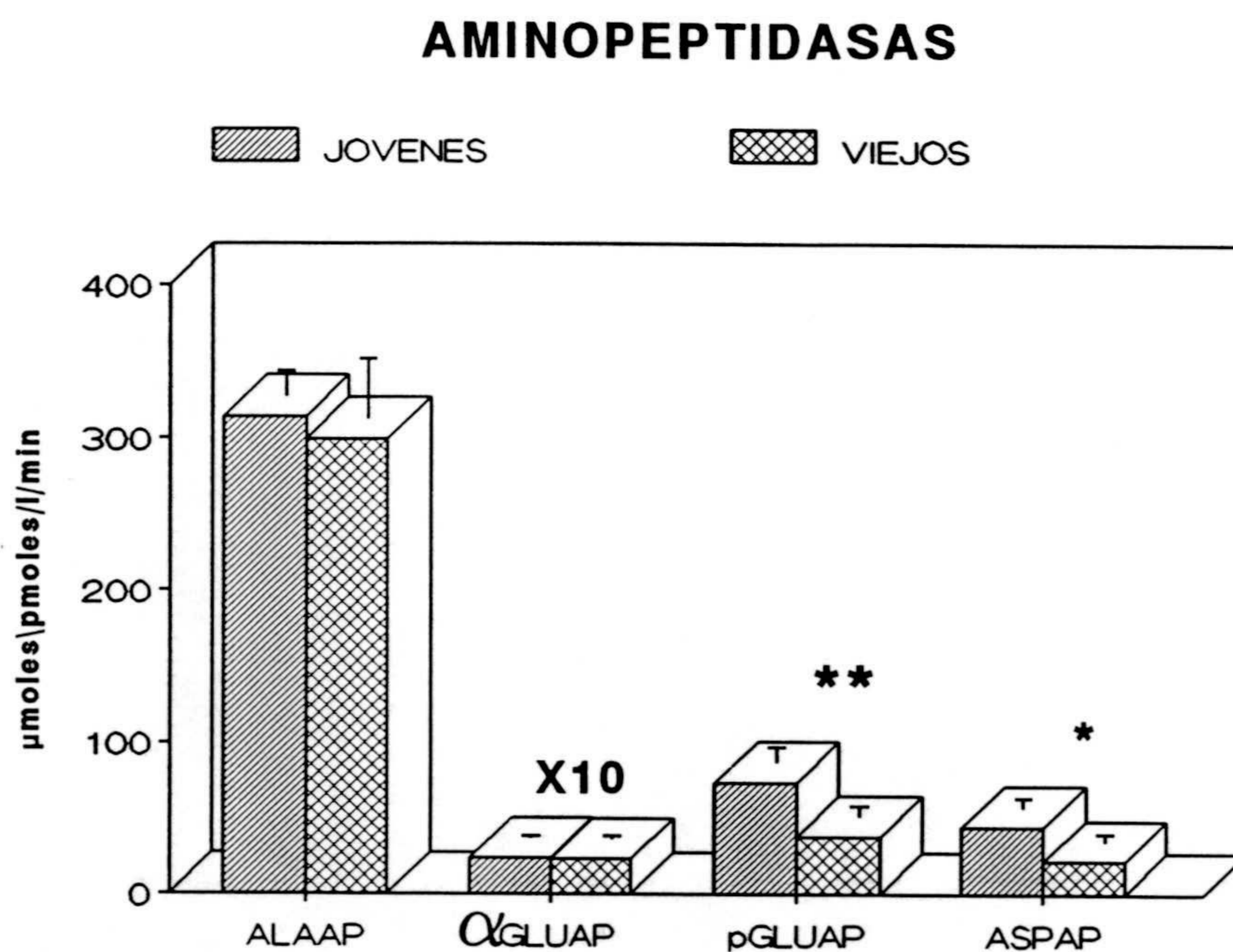
**FIGURA 28R.**-Representación de los niveles medios (*media±ES*) de Asp, Glu, Ser, Gln, Tau y Gaba, en la corteza frontal de individuos jóvenes y viejos. Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles/mgr}$  de tejido.

## **2.2.-EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA EN CORTEZA FRONTAL**

En este apartado se muestran los resultados obtenidos para la actividad Alani- (AlaAp),  $\alpha$ -glutamil- ( $\alpha$ GluAp), p-glutamil (pGluAp) y aspartilaminopeptidasa (AspAp).

Los resultados obtenidos para ambos grupos de edad se expresan como nanomoles/litro/minuto por mg. de tejido para la AlaAp y  $\alpha$ GluAP y como picomoles/litro/minuto por mg. de tejido para la pGluAP y AspAp.

El análisis estadístico (tést de Mann-Whitney) de estos resultados muestra diferencias significativas para la actividad pGluAp ( $p > 0.01$ ) y la actividad AspAp ( $p < 0.05$ ) (Figura 29R), siendo menores en ambos casos los valores obtenidos para animales viejos.



**FIGURA 29R.**-Representación de las actividades aminopeptidasas obtenidas en la corteza frontal de los individuos jóvenes y viejos. Unidades en  $\mu\text{moles/litro/min}$  para AlaAp;  $\mu\text{moles/litro/min X10}$  para  $\alpha\text{GluAp}$ ;  $\text{pmoles/litro/min}$  para pGluAp y AspAp.

## Resultados

---

# DISCUSSION

La corteza cerebral, y en particular la del polo frontal, es el soporte anatómico de muchas de las funciones cerebrales (cognitivas; memoria...) más afectadas durante el envejecimiento, especialmente en los cuadros de demencia (Brizze y col'76; Kemper'84; Terry y col'87). Sin embargo, los datos disponibles en la actualidad sobre los efectos del envejecimiento no patológico en la corteza frontal, e incluso en la totalidad del cerebro, no solo son escasos sino a menudo contradictorios (Terry y col'87). Contribuye a ello, por un lado, la heterogeneidad de los estudios disponibles, y por otro el hecho, de que el envejecimiento cerebral no afecta por igual a todos los individuos. Ambos aspectos serán tratados con detalle más adelante.

En el presente trabajo, se aborda el efecto del envejecimiento sobre la corteza frontal de la rata, desde dos diferentes, pero absolutamente complementarias perspectivas: la neurofológica y la neuroquímica. Ambas aproximaciones al tema, implican por un lado, el análisis cuantitativo de las poblaciones neuronal y neuroglial, y por otro el estudio de algunos aspectos funcionales de esas mismas células como son el contenido endógeno de aminoácidos neurotransmisores y otros aminoácidos, así como de la actividad de determinadas enzimas aminopeptidásicas implicadas en la degradación de neuropéptidos. Se discuten, a continuación los resultados obtenidos desde ambas perspectivas, en un intento de contribuir a esclarecer el sustrato morfofuncional subyacente al proceso de envejecimiento, en esta zona de la corteza cerebral.



## **1.-SOBRE EL EFECTO DE LA EDAD EN LAS POBLACIONES NEURONAL Y GLIA.**

### **1.1. VOLUMEN CORTICAL**

Son pocos los estudios que acotan anatómicamente una zona concreta de corteza y estiman el volumen de la misma por técnicas estereológicas (Curcio y Coleman' 82; Haug '84;). En la mayoría de los casos, las estimaciones se realizan en relación al grosor cortical (Diamond y col'75; Vaughan y Vincent'79; Henderson y col'80; Terry y col'87; Vincent y col'89). Sin embargo, este parámetro reviste una extraordinaria importancia ya que es punto de referencia inexcusable para la correcta valoración de otros aspectos cuantitativos. Concretamente en un trabajo realizado en corteza, sobre 76 cerebros humanos (Haug'84), se describe disminución del volumen cortical con el envejecimiento, junto a un ligero aumento de la densidad neuronal. Considerados estos dos aspectos separadamente, habrían conducido a una interpretación errónea de los resultados, que a la luz del estudio conjunto indican estabilidad en la población neuronal. La retracción encontrada para el volumen cortical, se interpreta por tanto, como disminución del espacio existente entre neuronas, es decir como disminución del neuropilo (Haug' 84).

En el presente estudio, hemos valorado el volumen cortical, no solo para aportar un nuevo dato sobre los efectos del envejecimiento en la corteza frontal, sino también para poder estimar de forma más completa y correcta, el resto de parámetros estudiados. Nuestros resultados indican, tanto considerando de forma independiente las diferentes capas corticales, como la totalidad de la corteza, que el volumen cortical no muestra variaciones edad dependientes. Cabe comentar, sin embargo, que los individuos viejos mostraron para la totalidad de la corteza una disminución del orden del 5% (más acusada en la capa I y menos en la capa V) pero que en ningún caso llegó a ser estadísticamente significativa. Así mismo, también hemos de reseñar que de forma individual uno de los 5 individuos viejos incluidos en el estudio (rata A26), presentó valores volumétricos significativamente menores que el resto de los animales analizados.

Nuestros resultados están de acuerdo con los encontrados por Curcio y Coleman (1982) en corteza somatosensorial de ratón, que describen disminuciones para el volumen cortical (especialmente para la capa IV) de un 7,8%. Esta disminución, al igual que en nuestro caso, no llegó a ser significativa debido a las altas varianzas existentes, incluso entre individuos de la misma edad.

Otra serie de trabajos, aunque estiman el grosor cortical en lugar de su volumen, también describen estabilidad para este parámetro con la edad tanto en neocorteza de humanos (Henderson y col'80; Kemper'84) y como de monos (Tigges y col'90; Vincent y col'89).

En ratas, se ha descrito que tanto el peso del cuerpo como el del cerebro continúan creciendo a lo largo de la vida (Hinds y McNelly '77, '81). De esta forma, el decrecimiento en la altura de la corteza encontrado por algunos autores (Vaughan y Vincent' 79) puede representar una redistribución más que una pérdida neta de volumen cortical (Daimond y col' 75) que permanece estable durante el envejecimiento. (Smith'34).

Estudios llevados a cabo en 76 cerebros humanos (Haug'84), estiman que el "volumen residual" (volumen del tejido después de la fijación, inclusión y tinción ) disminuye un 6% por encima de los 60 años respecto a los adultos jóvenes. Esta disminución varía en función de la zona valorada, habiéndose estimado retracciones en los ganglios basales (20%) o en el lobulo frontal (17%), pero no en el lobulo parieto-occipital.

También en humanos, esta vez midiendo grosor cortical, Terry y col. (1987) detectan disminución significativa de este parámetro en la corteza frontal ( $p < 0.01$ ), más escasa en la parietal ( $p < 0.05$ ) y nula en la temporal.

## 1.2. DENSIDAD NEURONAL.

En el caso de la densidad neuronal, nuestros datos tampoco reflejan cambios con la edad, ni en la totalidad de la corteza ni en cada una de las capas corticales consideradas independientemente. La información disponible en la literatura a este respecto, ofrece datos "realmente" contradictorios. Es por tanto obligado considerar la heterogeneidad de los mismos, particularmente en lo se refiere a la zona analizada (Sturrock 1986; 1991a; 1991b; Haug'83), el modelo animal objeto de la investigación (Morgan y col'87) y la metodología empleada en el estudio (Haug y col'84).

Tradicionalmente se ha venido aceptando que el envejecimiento implica pérdida neuronal (Brody'55; Brody'70). Brody (1955) realiza un estudio en corteza cerebral utilizando 20 cerebros humanos (3 neonatos, un niño, 4 adolescentes y 12 adultos desde 21 a 95 años). Aunque los resultado sobre envejecimiento están contaminado por los del desarrollo dada la edad de los sujetos, se describe pérdida neuronal en todos los lobulos cerebrales y a nivel de todas las capas corticales. No obstante, el mismo autor indica que el grado de deterioro varia de unas zonas a otras siendo el lobulo más afectado el temporal seguido del frontal, el occipital y finalmente el parietal (Brody '55). Así mismo, las pérdidas más acusadas se detectan fundamentalmente en las capas II y IV de la corteza. En un estudio posterior los mismos autores (Brody '70), cuantifican neuronas en el polo frontal, a nivel del giro frontal superior, en 18 sujetos comprendidos entre 41 y 87 años. Los datos encontrados muestran un fuerte correlación negativa entre recuentos celulares y envejecimiento, cifrando la pérdida neuronal en el 0.8% anual. Henderson y col. (1980) utilizando técnicas automáticas de análisis de imagen y realizando los recuentos neuronales en las mismas áreas de Brody, también describen en 64 cerebros, pérdidas neuronales con la edad que afectan al 50% de las neuronas consideradas grandes y al 35% de las pequeñas. Estos resultados se confirman por Anderson y col. (1983), que detectan de nuevo pérdida neuronal en corteza humana. No obstante, en ambos trabajos, se destaca la amplia variación encontrada entre diferentes individuos, incluso de la misma edad (Henderson y col.'80; Anderson y col.'83).

Estudios más recientes, por el contrario aportan datos que refuerzan nuestros resultados y que conducen a abolir la clásica concepción de que la longevidad solo podía alcanzarse a costa de una fuerte deplección nerviosa. Así, Haug y col. (1984; 1985) analizan 120 cerebros humanos, estimando la población de células nerviosas mediante análisis de imagen computarizado. Los autores hacen énfasis en que las perdidas neuronales detectadas con el envejecimiento, pueden ser consecuencia de la diferente retracción que sufre el tejido nervioso de jóvenes y viejos durante el proceso de inclusión en parafina. Concretamente estiman que el metil benzoato, un intermediario usado entre el alcohol y la parafina, retrae a los especímenes jóvenes por encima del 15% más que a los viejos. Según estas observaciones, si no se considera esta retracción diferencial producida por la técnica, se pueden estar

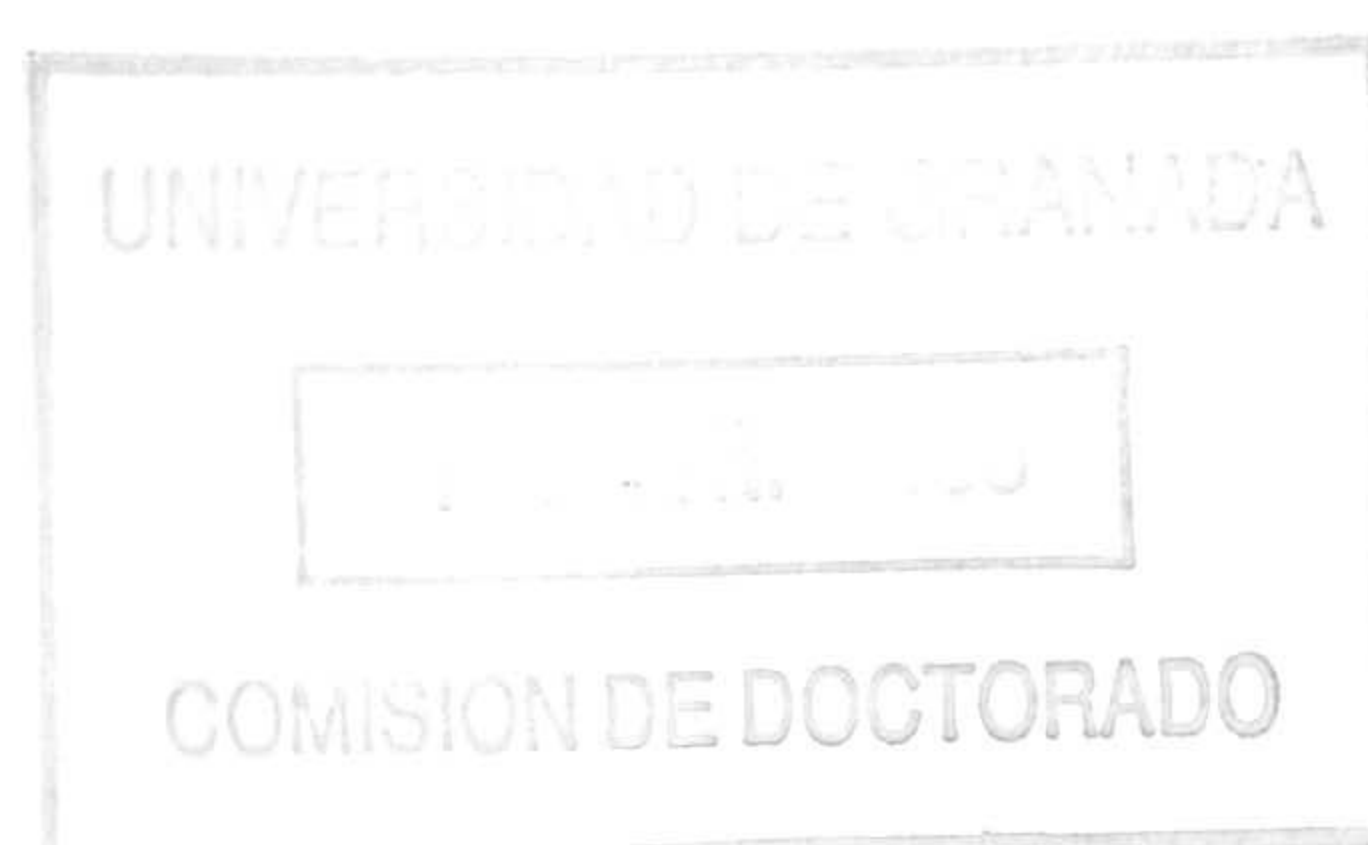
realizando estimaciones un 15% más bajas para la densidad neuronal en viejos frente a jóvenes. En cualquier caso, sus estudios llegan a la conclusión de que el número total de células en corteza permanece invariable durante el envejecimiento (Haug y col. '84, '85). Otros estudios han demostrado, que por el contrario no existe retracción diferencial entre material de especímenes jóvenes y viejos cuando en lugar de metil benzoato se utiliza xileno, un intermediario de uso tradicional en la inclusión (Anderson y col' 83; Terry y col'87). En nuestro caso la inclusión fue efectuada, usando xileno como intermediario, y sometiendo los cerebros de todos los individuos a procedimientos idénticos por lo que las retracciones producidas se puede considerar que afectaron a todos los sujetos por igual.

En roedores los estudios efectuados en este terreno tienden en su mayoría a documentar poca o ninguna pérdida neuronal en relación a la edad. Incluso en zonas como la sustancia negra, donde la pérdida neuronal (neuronas dopaminérgicas) en humanos puede alcanzar valores del 60% (McGeer y col'77) apenas alcanza un 20% en rata (Morgan y col'87). En esta línea, Curcio y Coleman (1982) en un estudio realizado en corteza somatosensorial de ratón tampoco encuentran pérdida neuronal con la edad.

Todavía contribuye más a la confusión existente, estudios que llegan a resultados variables según la zona analizada incluso dentro de la misma especie. En este sentido, Sturrock (1991b) encuentra descenso del número de neuronas en el núcleo del estrato de la comisura blanca anterior de ratón. Por el contrario este mismo autor, también en cerebro de ratón, encuentra estabilidad con la edad en indusium griseum (Sturrock '86) y en los núcleos subtalámico y entopeduncular (Sturrock '91a).

Estudios más recientes realizados en el área 17 de la corteza cerebral de primates, plantean que más que una pérdida neuronal real pueda existir cierto grado de degeneración, la cual afectaría fundamentalmente a la arborización dendrítica y a los axones (Vincent y col'89).

Terry y col. (1987) encuentran aumento de la población de neuronas pequeñas (menores de  $40\mu^2$ ) frente a una disminución de las neuronas grandes (mayores de  $90\mu^2$ ). Interpretan sus resultados en el sentido de que las células de tamaño mayor sufren retracción con el paso del tiempo y pasan a engrosar el número de células pequeñas (Terry y col.'87). Así pues, la valoración del tamaño del soma y núcleo neuronal, podría ser una forma indirecta de estimar la posible existencia de neurodegeneración.



### 1.3. AREAS DEL SOMA Y NÚCLEO NEURONAL

Respecto a las áreas del soma y núcleo neuronal, parámetros que pudieran ser indicativos de posible neurodegeneración, nuestros resultados detectan descensos significativos de ambos con el envejecimiento. Estos descensos son más acusados sobre todo en las capas II-IV y VI, que son las capas de mayor densidad neuronal. No obstante, cabe destacar que nuestros datos muestran una gran variabilidad, incluso, entre individuos incluso del mismo grupo de edad. Tal es el caso de uno de los individuos jóvenes, el A01, que presentó valores de significativamente inferiores a todos los demás; en esta misma línea, el individuo viejo A68, podría considerarse dentro del rango de tamaños propios de los individuos jóvenes. Así pues, si el envejecimiento produce retracción neuronal, esta no afectaría a todos los individuos por igual.

Sentadas estas bases, podemos afirmar que nuestros resultados coinciden con los obtenidos en corteza humana (Anderson y col '83; Haug y col '84; Terry y col'87) y de la rata (Brizzee y col '75). También resultan compatibles con las observaciones de Strehler (1983) que indican pérdidas sustanciales de DNA en neuronas viejas. Se puede, de esta forma, especular que la actividad nuclear podría estar correlacionada con cambios neurodegenerativos y metabólicos de las neuronas, que podrían manifestarse morfológicamente en forma de disminución del tamaño nuclear y del soma (Terry y col'79). Estudios realizados en la corteza auditiva de ratas viejas (Vaughan y Vincent'79) detectan asimismo, pérdidas en el área nuclear de las neuronas de la capa V, pero no en las de la capa II. Este estudio, efectuado a nivel ultraestructural, solo analiza estas dos capas, encontrando escasos cambios en los orgánulos de las neuronas con el envejecimiento.

En un estudio posterior realizado por Vincent y col. (1989), no se detectan variaciones en el diámetro del núcleo de las neuronas del área 17 de la corteza visual de mono. No obstante su estudio, realizado sobre cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, solo analiza 25 perfiles nucleares por individuo en las capas II/III, IVc y VIa, por lo que sus datos son difícilmente comparables con los encontrados por nosotros. Este mismo trabajo indica, sin embargo, que tiene lugar cierto grado de degeneración en la zona evaluada por la presencia masiva en los somas neuronales de acumulos de lipofushina, y grandes vacuolas de diámetro superior a 10 $\mu$  en el neuropilo circundante. Especular con la idea de que tales vacuolas corresponden a huecos dejados por posibles neuronas perdidas, es descartado por los autores en base que no encuentran en su material de los pasos intermedios en el proceso de degeneración neuronal. Sí detectan en individuos viejos, axones mielínicos en proceso de degeneración con contenido hialoplasmático denso e irregular, y en algunos casos dendritas con inclusiones vacuolares rodeadas de membrana. En roedores, concretamente en corteza somatosensorial de ratón Curcio y Coleman (1982) inciden sobre la degeneración vacuolar,

interpretándola en este caso como pérdida de neuropilo. Basan su interpretación en estudios previos, que documentan con la edad, cambios en la longitud y forma del árbol dendrítico (Sheibel y col '75), pérdida de sinapsis (Hunttenlocher '79) y cambios en la extensión y volumen de los lechos vasculares (Knox y Oliveira '80).

Evidentemente, conocer en detalle el alcance del proceso de envejecimiento, el grado en que afecta a los somas neuronales y al neuropilo, e incluso sí realmente se puede hablar de neurodegeneración, requerirá estudios ultraestructurales complementarios dirigidos a tal fin.

#### 1.4. DENSIDAD GLIAL Y ASTROCITARIA

Otra forma de enfocar este tema, consiste en estudiar el comportamiento de la población glial. Así, es un hecho admitido hoy día, que cualquier proceso de injuria al cerebro (herida, isquemia o enfermedad) que implique neurodegeneración, produce proliferación glial (Janecko'89; Mathewson y Berry'85; Hausen y col'87; Mjers y col'91; Ma y col'91; Hajós y col'90).

En este terreno, se ha aseverado (Sturrock'83) que muchos de los cambios en el número de células gliales son secundarios a cambios en el número de neuronas o en su actividad metabólica. Concuera esta concepción con estudios bioquímicos que encuentran con la edad, incrementos en la actividad de ciertos enzimas como la glutamina-sintetasa, enzima de localización exclusivamente astroglial (Cao y col'85; Peinado y Myers'88).

En esta misma línea, se encuentran trabajos experimentales sobre hipertrofia astroglial (incluido incremento en los niveles de GFAP) que tiene lugar como consecuencia de daño axonal, incluso para tractos de fibras situados muy distales de los lugares estudiados (Nathaniel y Nathaniel'81). Así pues, la degeneración axonal, sería otra causa de inducción glial, más todavía si se tiene en cuenta que los astrocitos segregan factores tróficos que permiten el crecimiento y remodelación de las prolongaciones neuronales (Tardy'91). Otro ejemplo de este planteamiento, lo constituye un estudio efectuado utilizando el método del cloruro de oro de Cajal, (Lanfield y col'77) que describe en hipocampo de ratas viejas con deficiencias en la memoria, hipertrofia astrocitaria asociada a pérdida de neuronas piramidales.

Nuestros resultados, que documentan la existencia de incrementos de la densidad glial con el envejecimiento, del orden del 20% para la globalidad de la zona de corteza estudiada, podrían interpretarse según lo comentado, en el sentido de que la edad produce al menos cierto grado de neurodegeneración o si se prefiere de deterioro y disfuncionalidad nerviosa

Son numerosos los estudios que describen aumentos de la población glial con el envejecimiento no solo en corteza humana (Hansen y col'87), sino también en corteza de ratón (Heumann y Leuva'83) y de rata (Brizzee y col'68; Brizzee'75; Vaughan y Peters'74; Lanfield y col'77). Existen por el contrario, otros que no encuentran incremento en el número de células gliales con el envejecimiento. Tal es el caso de los estudios de Diamond y col. (1977) llevados a cabo en corteza occipital medial de rata, y los de Curcio y col. (1982) en corteza somatosensorial de ratón

Un tercer grupo de estudios, si bien no detectan incrementos significativos en el número de células gliales con la edad, describen sin embargo, situaciones de hipertrofia astrocitaria, que evidentemente también podrían ser interpretadas al hilo de posibles cambios degenerativos. Estudios efectuados en corteza occipital mediante técnicas de análisis de imagen sobre astrocitos GFAP positivos revelan incrementos sensibles para soma y prolongaciones de estas células (Björklund y col'85).

En una línea similar, estudios ultraestructurales en corteza occipital de mono, demuestran aumento en la cantidad de filamentos presentes en los astrocitos sobre todo en aquellos cuyas prolongaciones forman la membrana limitante externa (Peters y col'91). Los autores especulan con la idea de que la reacción glial de astrocitos superficiales es consecuencia de la marcada degeneración que paralelamente detectan en el árbol dendrítico de las neuronas de la capa I.

Nuestros resultados, indican gliosis en todas las capas corticales con el envejecimiento, aunque al igual que para el caso de las áreas del soma y núcleo neuronal, el proceso afecta de forma diferencial a cada una de ellas. En este sentido, la capa I presentó un incremento del 19,7%, la II-IV del 21,61%, la V del 16,62% y finalmente la VI del 21,28%.

El análisis de la población astrocitaria, efectuado mediante el cálculo de la densidad de astrocitos GFAP positivos, indicó resultados concordantes con los que acabamos de exponer para el conjunto de la población glial. También en este caso se ha detectado un aumento significativo de la densidad astrogial con la edad que puede cifrarse en torno a un 8,11% para la totalidad de la corteza. Este incremento con el envejecimiento, al igual que lo observado para el conjunto de la población glial, varió en función del nivel cortical analizado. Así las diferencias encontradas fueron mucho más significativas a niveles medios (17,72% ) que a nivel superficial (3,77%) e interno (4,28%).

Si consideramos la corteza frontal en su conjunto, hemos visto como la población glial, es decir astrocitos, oligodendrocitos y microglia, aumentan en ratas viejas un 20% respecto a las jóvenes. Sin embargo, cuando se consideran de forma independiente los astrocitos el aumento global solo alcanza un 8,11%. La consecuencia inmediata que se deriva de estos datos, es que además de los astrocitos otras células gliales contribuyen al incremento detectado con la edad en la población glial.

Continuando en esta misma línea de razonamiento, se podrían extraer conclusiones, no solo a nivel del conjunto de la corteza sino analizando las diferentes capas corticales consideradas. Evidentemente en este caso, se ha de tener en cuenta que la población glial en su conjunto fue estudiada considerando 4 capas corticales (I, II-IV, V, VI), y sin embargo, para la astrogial el estudio se realizó solo en tres niveles corticales (superficial, medio e interno). Partiendo de esta base, se puede establecer una correspondencia entre capas y niveles para poder comentar los datos conjuntamente.

Considerando que las capas I y II corresponderían al nivel superficial, las capas III y IV al nivel medio y las V y VI al nivel interno, se puede especular con la idea de que el incremento de células gliales encontrado en los niveles corticales medios con el envejecimiento, podría ser debido sobre todo a los astrocitos mientras que en el caso de los niveles superficial y profundo los incrementos serían debidos a otros tipos gliales (microglia y oligodendrocitos). En cualquier caso, no somos ajenos a que elucidar totalmente estos aspectos, requerirá de mas estudios cuantitativos que insistan en el marcaje selectivo de cada uno de los tres tipos de células gliales. Se puede indicar sin embargo, admitiendo que el aumento de células gliales implique algún tipo de neurodegeneración con la edad, que todas las capas corticales no se ven afectadas por igual. Hansen y col. (1987), en un trabajo realizado en corteza frontal humana, cuantifica astrocitos fibrosos en las diferentes capas corticales; sus resultados documentan aumentos significativos de estas células con la edad avanzada en todas las capas corticales excepto en la I.

Finalmente se ha de comentar el hecho de que tampoco el aumento encontrado para la glia con la edad afectan a todos los individuos por igual, no obstante, los tést de rango múltiple realizados, detectan con mayor claridad que para el caso del soma y núcleo neuronal, una dependencia de este parámetro con la edad. Esta heterogeneidad entre individuos parece ser esta una constante, de la mayoría de los estudios morfológicos efectuados sobre envejecimiento normal (Hansen y col '87; Peters y col '91)) lo cual evidentemente también contribuye a la inconsistencia de los resultados en este campo comentados inicialmente. Más adelante, y dada la importancia del tema volveremos a incidir sobre este aspecto, una vez analizados los datos bioquímicos.



## **2.- SOBRE EL EFECTO DE LA EDAD EN LOS NIVELES BASALES DE AMINOACIDOS.**

### **2.1 CONSIDERACIONES PREVIAS**

La cuantificación del contenido tisular de Glu, como el de otros aminoácidos, evalúa conjuntamente el "pool" neuronal y glial, así como el "pool" neurotransmisor y metabólico. (Fonnum'84) Por tanto hay que tener presente que variaciones cuantitativas de cualquiera de estos compartimentos pueden quedar enmascaradas al representar pequeños cambios porcentuales respecto al total. De igual forma variaciones en la concentración de cualquiera de estos aminoácidos es difícilmente atribuible de forma específica a alguno de estos compartimentos. No obstante, siempre pueden establecerse correlaciones causa/efecto. Tal es el caso, por ejemplo, de la descripción de vías aminoacídicas basadas en la lesión de los somas celulares origen de la vía y la cuantificación tisular de aminoácidos en las zonas de proyección. Con esta técnica se han descrito descensos de hasta un 30% en el contenido tisular del aminoácido que específicamente actúa como neurotransmisor (Peinado y Mora'86).

Otra consideración inicial se basa en el hecho de la posible existencia de dos poblaciones diferenciables de ratas viejas, en cierta manera equiparables a lo que en humanos

hemos venido denominando como envejecimiento normal y envejecimiento patológico o demencia (Gallagher y Pelleymounter, 1988). Concretamente se han distinguido animales viejos impedidos ("impaired") y no impedidos ("non impaired") respecto a determinadas pruebas de memoria y aprendizaje. (Gallagher y Pelleymounter'88). Estas diferentes alteraciones conductuales se han correlacionado con modificaciones en marcadores bioquímicos específicos como la captación de colina (Decker y col'88) o el contenido de péptidos opiáceos (Jiang y col'89). En la presente serie de experimentos, tanto en lo que hace referencia al apartado que ahora se discute, como en lo relacionado con los aspectos morfológicos anteriormente comentados, la población envejecida se ha considerado como "única", lo cual podría enmascarar determinadas alteraciones que podrían ir exclusivamente asociadas a la población "impedida".

## 2.2 AMINOACIDOS EXCITADORES

Los resultados de la presente investigación muestran un incremento en los niveles basales de ácido glutámico en homogenizados obtenidos de la corteza frontal de animales viejos. Sin embargo no se encuentra modificación alguna en el contenido de ácido aspártico. Estos datos confirmarían las hipótesis que sugieren un incremento de la actividad glutamérgica como posible sustrato neuroquímico de los procesos de neurodegeneración que acompañarían al envejecimiento cerebral en general, y al de la corteza frontal en particular. (Dicther y Choi'89). La confirmación experimental de esta hipótesis presenta, sin embargo, contradicciones entre los distintos autores y áreas. Frente a estudios que muestran descensos con la edad en los niveles de Glu encontramos otros que no muestran variaciones o incluso describen incrementos.

La interpretación de nuestros datos en el contexto de la literatura, ha de tener por tanto en cuenta los diferentes modelos experimentales, áreas estudiadas, edades consideradas o métodos de análisis empleados.

En este sentido, Banay-Schwartz y col. (1989) en un amplio trabajo en el que analizan numerosas regiones cerebrales en animales de 29 meses, no encuentran diferencias con la edad en distintas áreas de la corteza cerebral como son la sensorial, motora o visual en el contenido de Glu. Sin embargo en el núcleo cuneatus encuentran un incremento de este mismo aminoácido de un 60%, y un descenso en el núcleo coclear del 24%. En otras muchas regiones el contenido de Glu no se modifica con la edad. Muy diferente es el caso del ácido aspártico. Estos mismos autores describen variaciones con la edad en numerosas regiones

cerebrales. Concretamente describen descensos para este aminoácido en corteza sensorial y visual, así como en otras áreas subcorticales. Solamente describen incrementos en el núcleo coclear. (Banay-Schwartz y col'89).

Otros estudios, revelan descensos significativos con la edad del 17% en los niveles de Glu en corteza frontal en animales de 24 meses (Dawson y col'89). Este resultado es interpretado por los autores en términos de pérdida neuronal generalizada, o defecto en el compartimento metabólico bien neuronal bien glial, ya que el análisis en el mismo estudio de marcadores específicos de la transmisión glutamérgica como la liberación evocada o la captación de alta afinidad no varían con la edad. En este mismo estudio ninguno de los parámetros analizados para el ácido aspártico varía con la edad (Dawson y col'89). Estos datos se repiten en pacientes de Alzheimer, en los que se han descrito descensos en el contenido de Glu en corteza e hipocampo (Arai y col'85; Ellison y col'86; Sasaki y col'86).

En "slices" de corteza frontal de ratas de 24 meses, la liberación basal como estimulada por altas concentraciones de  $K^+$ , no presenta variaciones significativas (Dawson y col'89). Idénticos resultados se han encontrado con enfermos de Alzheimer en modelos experimentales semejantes (Peinado y col'89). Por el contrario, estudios de captación muestran resultados variables, con descensos significativos (Najlerhim y col'90) o no variaciones (Dawson y col'89) en sinaptosomas de ratas viejas, 24 meses. Es llamativo el hecho de que estos descensos tienden a mantenerse o incluso desaparecer (ratas de 35 meses) conforme aumenta la edad (Najlerhim y col'90). Esto ha sido interpretado por los autores como la posible finalización de un proceso de pérdida sináptica y el inicio de la actuación de mecanismos compensatorios (Najlerhim y col'90). En pacientes de Alzheimer se han descrito descensos significativos en la captación  $Na^+$  dependiente en diferentes áreas de corteza e hipocampo (Hardy y col'87; Procter y col'88b).

Similares resultados se describen cuando los estudios se aproximan al análisis del pool neurotransmisor. Tal es el caso de estudios de perfundidos intracerebrales *in vivo*, los cuales valoran el contenido de aminoácidos en el espacio extracelular. Si bien el contenido de aminoácidos extracelulares tiene un origen diverso, se acepta generalmente que el 25% del Glu valorado en perfundidos está asociado al pool neurotransmisor. (Girault y col'86). Estudios de estas características han revelado un descenso edad relacionado en la liberación de Glu (Nieto y Peinado'91).

En hipocampo sin embargo se ha descrito un incremento edad relacionado en la fijación de Glu (Baudry y col'81). Este incremento en el número de receptores podría explicarse como un mecanismo compensatorio del déficit en la liberación.

Los resultados encontrados en la literatura, a pesar de la variabilidad observada, tienden a mostrar descensos o no modificación, en la valoración de la actividad de

aminoácidos ácidos con la edad. Esto contrasta con el incremento de Glu encontrado en la presente Tesis. Una posible explicación podría derivar de la edad de los animales empleados por nosotros, 33 meses, frente a los 24 meses habitualmente empleados en la literatura. Es posible que un fenómeno de supervivencia este afectando a los resultados, y que los animales muy viejos constituyan un grupo seleccionado en virtud de su supervivencia, presentando el proceso de envejecimiento de una forma más lenta.

### 2.3.-OTROS AMINOACIDOS

En el presente estudio otros aminoácidos neurotransmisores, como el GABA o la Tau, o precursores como la Gln o la Ser, no presentaron variaciones entre individuos de distinta edad.

El GABA es probablemente el neurotransmisor de tipo aminoácido más ampliamente estudiado.(Davidson'90). Esta premisa también se cumple para los estudios de envejecimiento(McGeer y McGeer'81a).

Nuestros resultados contrastan con los descritos por otros autores para la corteza cerebral, en los cuales se muestra un descenso edad relacionado en diversas especies como la rata, el mono o el hombre.(Allen y col'83; Banay-Schwartz y col'89a; Davies y Himwisch'75; Perry y col'83). Específicamente en la rata, el GABA no se modifica en la corteza sensorial, experimentando descensos en corteza visual y motora, junto con otras áreas subcorticales (Banay-Schwartz'89a). En cuanto a las modificaciones en los niveles de GABA hay que ser extremadamente cuidadoso ya que es un aminoácido que incrementa significativamente su síntesis postmortem (Banay-Schwartz'89a). Es por esto que en la presente investigación las muestras han sido congeladas inmediatamente tras su extracción.

El papel del GABA como neurotransmisor se ha localizado fundamentalmente en interneuronas de carácter inhibitorio (Iversen'82). Estas neuronas parecen no sufrir modificaciones con la edad (Terry'87), lo que explicaría la ausencia de variaciones en los niveles de GABA tisular. La actividad del enzima responsable de la síntesis de GABA, la GAD, tampoco muestra cambios con la edad (McGeer y McGeer'81a).

Otro aminoácido que no muestra en el presente trabajo variaciones con la edad es la Glutamina. Como se ha mencionado con anterioridad la Gln forma parte de la secuencia de inactivación y síntesis de Glu. El Glu liberado sería captado por la glia e inactivado por acción de la glutamin sintetasa, enzima específico de la glia, rindiendo Gln. Esta sería

transferida de nuevo a las neuronas para su reconversión en Glu (McGeer y McGeer'89). La cuantificación de la Gln, junto a la del Glu, evalúa por tanto no solo el comportamiento del pool neuronal sino también del glial (McGeer y McGeer'89). Mas aun teniendo en cuenta que durante los procesos de envejecimiento se ha descrito no solo un incremento en la población glial (Terry'87), sino también un incremento en la actividad glutamin sintetasa (Cao y col'85). Este incremento en la actividad de este enzima, e incluso el incremento en la población glial por nosotros aquí descrita, no se corresponde con incrementos en el contenido total de Gln en homogenizados de la corteza frontal. Nuestros resultados confirman los de otros autores para la corteza frontal (Dawson y col'89) y para otras áreas corticales (Banay-Schwartz y col'89a).

Sin embargo cuando la aproximación experimental se refiere a la evaluación del pool de Gln implicado en la neurotransmisión glutamérgica -liberación de Gln en "slices" de corteza frontal o liberación in vivo- los resultados son contradictorios. Mientras en "slices" no se detectan variaciones con la edad (Dawson y col'89), estudios in vivo de nuestro propio laboratorio, describen incrementos en la liberación de Gln en ratas de 24-30 meses de edad (Nieto y Peinado'91).

La Taurina tampoco parece modificarse con la edad. En este sentido nuestros resultados confirma los descritos por otros autores para la corteza frontal (Dawson y col'89) o motora (Banay-Schwartz y col'89b). Sin embargo se han descrito descensos de Tau en corteza sensorial (Banay-Schwartz y col'89b) que no son explicados por los autores. La Tau, aunque en elevada concentración en corteza (Collins'74) no parece jugar ningún papel relacionado con la neurotransmisión en este área cerebral (Davidson'90).

En la presente serie de experimentos, tampoco la Ser sufre modificaciones. Aun cuando se han descrito cambios con la edad en el contenido de Ser en corteza frontal (Davidson'90), su significación funcional es desconocida, si bien se ha relacionado con alteraciones en la síntesis de fosfolípidos (Davidson'90).

### **3.- SOBRE EL EFECTO DE LA EDAD EN LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASICA.**

El papel fisiológico de las aminopeptidasas en particular, y de las peptidasas en general en el SNC, es un tema sometido a continuo debate. Hay aminopeptidasas capaces de degradar *in vitro* determinados neuropeptidos (Horsthemke'84) dependiendo de su secuencia de aminoácidos, pero sin embargo, la distribución regional de estas enzimas en el SNC no suele coincidir con la de los neuropeptidos susceptibles de ser degradados por ellos (Vargas y col'87). Además no todas las aminopeptidasas tienen igual ubicación dentro de la célula. Hay peptidasas solubles presentes en citosol y líquido extracelular (Barrett y McDonald'86), peptidasas ligadas a membrana, ectoenzimas, situadas en el sinaptosoma para poder degradar neuropeptidos en el espacio sináptico (Hazum y col'79), y peptidasas con localización mitocondrial y lisosomal (Krischke y col'77).

Nuestro estudio se ha centrado en la cuantificación de enzimas solubles citosólicas presentes en tejido cerebral de corteza frontal, y por tanto puede incluir tanto aminopeptidasas neuronales como de origen glial. (Koshiya y col'85). Estas aminopeptidasas solubles podrían formar parte de uno de los mecanismos fisiológicos de inactivación sináptica de neuropeptidos, pues si bien hasta ahora no se ha podido reportar liberación de estas enzimas subsecuente a despolarización, sí que se ha descrito liberación aminopeptidásica tras estimulación farmacológica (Greenfield y Shaw'82).

La Ala-AP es responsable de aproximadamente un 80% de la actividad aminopeptidásica detectada en corteza cerebral humana (Matle y col'89). Además es capaz de hidrolizar péptidos con diversos aminoácidos N-terminales, especialmente alanina, metionina, fenilalanina y leucina (Smith y col'65). Es precisamente su gran inespecificidad de sustrato y su amplia localización celular lo que la hace constituirse en un buen control del comportamiento general de las aminopeptidasas cerebrales. La actividad Ala-AP no se modifica en la presente investigación en el grupo de animales de 33 meses respecto al grupo joven, hecho esperable en base a las características del enzima Ala-AP y a las posibles interferencias de otras aminopeptidasas neutras en la cuantificación fluorimétrica de actividad sobre un sustrato artificial tipo Ala  $\beta$ -naftilamida.

Las otras tres aminopeptidasas estudiadas,  $\alpha$ -Glu-AP, pGlu-AP y Asp-AP, tienen en común su capacidad para hidrolizar aminoácidos acídicos, o posiblemente acídicos al romperse el ciclo piroglutámico. Este tipo de aminoácidos son bien conocidos por su neurotoxicidad mediada por receptores NMDA (Monaghan y col'89) y se cree que puedan jugar un papel importante en los procesos normales de deterioro mental edad dependiente e incluso en los claramente patológicos, como la enfermedad de Alzheimer (Maragos y col'87). Los resultados obtenidos sobre la actividad  $\alpha$ -Glu-AP, pGlu-AP y Asp-AP no muestran ningún incremento en el grupo de animales viejos, por lo que no podemos hablar de un posible papel de estas enzimas como generadores de aminoácidos. Los incrementos detectados en la concentración tisular de ácido glutámico no serían, por tanto, consecuencia de la actividad de estas enzimas.

Por el contrario, los resultados permiten hablar de descensos significativos en las actividades pGlu-AP y Asp-AP para el grupo de animales viejos respecto a los jóvenes. Estos descensos de actividad tampoco parecen reflejarse en modificaciones aminoacídicas, por lo que el significado fisiológico de este hallazgo tiene que incluir modificaciones en la neurotransmisión peptidérgica.

La pGlu-AP soluble se ha demostrado capaz de hidrolizar *in vitro* gastrina, LH-RH y neurotensina (Horsthemke y col'84) y resulta un inactivador específico de la TRH (Friedman y Wielk'85). La TRH está considerada como un posible neurotransmisor en sistema nervioso central (Björklund y Hökfelt'85), pero mientras los niveles de TRH a nivel cortical son muy bajos, los de pGlu-AP son medios en relación a otras áreas cerebrales (Vargas y col'87). Esta falta de correlación se interpreta como indicio de que la inactivación del neuropéptido ocurre en espacio extracelular dependiendo de coyunturas temporales y espaciales (Kenny'86).

Por todo ello, los resultados obtenidos con una menor actividad pGlu-AP en la corteza frontal de ratas viejas, podría corresponderse con una menor tasa de degradación de la TRH cortical. A su vez, la TRH al ser degradada genera un metabolito activo la His-Pro-dicetopiperacina (Bauer y Kleinkauf'80) que puede actuar como agonista o antagonista de la

TRH según las condiciones fisiológicas del medio (Prosad'85). Es decir, que nuestros resultados sugerirían alteraciones de las vías corticales frontales que utilizan TRH como neurotransmisor, en ratas viejas, extremo que podría puntualizarse con un posterior estudio de niveles tisulares de TRH.

No obstante, la explicación de los datos aquí aportados podría partir de una hipótesis contraria a la mantenida en el párrafo anterior. Tal vez, la modificación original pudiera estar en los niveles corticales de TRH y sus variaciones alterar la actividad aminopeptidásica. A favor de esta teoría está el hecho descrito de modificaciones en la actividad pGlu-AP sérica de rata según la función tiroidea del animal, aumentando en el hipertiroidismo y disminuyendo en el hipotiroidismo (Emerson y Wu'87). Sin embargo la función tiroidea se conserva bien durante la vejez (Gregerman y Davis'78), aun cuando la sensibilidad de la hipófisis a la estimulación con TRH se modifica con la edad (Azizi y col'75).

La actividad Asp-AP cuantificada puede deberse a la acción del enzima específico Asp-AP, pero también en menor proporción la  $\alpha$ -Glu-AP y la Ala-AP, que también son capaces de degradar sustratos con Asp N-terminal. No obstante, nuestros resultados excluyen la posibilidad de que estos dos últimos enzimas mencionados modifiquen la actividad Asp-AP ya que no se encuentran cambios cuando se cuantifican las actividades frente a sus sustratos específicos. Por tanto, en este caso, cabe hablar con propiedad de un descenso edad dependiente de la actividad del enzima Asp-AP en corteza frontal de rata, enzima que por otra parte nunca ha sido purificado a partir de extractos cerebrales.

La significación fisiológica de este resultado es algo de momento desconocido. Se ha sugerido que la Asp-AP pudiera estar implicada en la degradación in vivo del péptido angiotensina II (A II), presente en sistema nervioso en conexión con el control central de la ingesta de agua (Phillips'80). Sin embargo, no ha podido demostrarse ni presencia de A II ni de sus receptores en corteza cerebral (Van Houten y col'80).

El hecho de que las actividades pGlu-AP y Asp-AP resulten disminuídas en corteza frontal de ratas viejas no se debe en absoluto a posibles interferencias de acción sobre ambos sustratos, ya que desde hace tiempo está bien definido su no solapamiento a este respecto (Bauer y Novak'79). Curiosamente, se ha descrito una modificación pareja de estos dos enzimas en suero de pacientes cirróticos (Mejías'90, Tesis Doctoral), sin que tampoco haya podido sugerirse una causa para este emparejamiento.





# CONCLUSIONES

PRIMERA. El análisis del volumen de la corteza frontal y de su densidad neuronal no presenta modificaciones relacionadas con la edad. No parece, por tanto, que en la rata exista pérdida neuronal en esta área cortical asociada al envejecimiento.

SEGUNDA. La densidad glial en la corteza frontal de la rata, presenta un aumento significativo con la edad en todas las capas corticales evaluadas. Este aumento es debido, al menos parcialmente, al incremento específico de la población astrocitaria, particularmente en las capas medias corticales. La alteración glial sería expresión de cierto grado de deterioro/degeneración de la arquitectura de la corteza frontal de la rata vieja.

TERCERA. Las áreas del soma y núcleo neuronal se reducen en la corteza frontal de los individuos viejos. Esta disminución afecta especialmente a los somas de las capas II-IV y VI y al núcleo de las capas II-IV, V y VI. Existe en todos los casos una patente correlación entre las áreas del soma y núcleo neuronales.

CUARTA. Los niveles tisulares de ácido glutámico en la corteza frontal aumentan significativamente en el grupo de animales viejos. Este aumento podría ejercer un efecto citotóxico, aunque a la edad en que se ha realizado el presente estudio no parece ocasionar pérdida neuronal.

QUINTA. Las actividades piroglutamil y aspartil aminopeptidásicas disminuyen en la corteza frontal del grupo de animales viejos. Esta disminución podría correlacionarse con cambios edad-dependientes en la transmisión peptidérgica.

## Conclusiones

---

# **BIBLIOGRAFIA**

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. Anat. REC. 94:239-247. (1946).

ADAMS, C.W.M. AND GLENNER, G.G. Histochemistry of myelin - IV. Aminopeptidase activity in CNS and PNS. J.Neurochem 9:233-239 (1962).

AGDUHR, E. A contribution to the technique of determining the number of nerve cells per volume unit of tissue. Anat. Rec. 80:191-202. (1941).

AGGLETON, J.P., BLINDT, H.S. AND CANDY, J.M. Working memory in aged rats. Behav neurosci 103:975-983 (1989).

AGRAWAL, H.C., DAVISON, A.L. AND KACZMERAK, L.K. Subcellular distribution of taurine and cysteine sulphinate decarboxylase developing rat brain. Biochem. J. 122: 759-63 (1971).

ALGERI, S., CALDERINI, G., LOMUSCIO, G. AND COL. Differential response to immobilization stress of striatal dopaminergic and hippocampal noradrenergic system in aged rats. Neurobiol. Aging. 9 (2): 213-6 (1988).

ALLARD, P. AND MARCUSSON, J.O. Age-correlated loss of dopamine uptake sites labeled with [<sup>3</sup>H]GBR-12935 in human putamen. Neurobiol. Aging. 10 (6): 661-4 (1989).

ALLEN, S.J., BENTON, J.S., GOODHART, M.J. AND COL. Biochemical evidence of selective nerve cell changes in the normal aging human and rat brain. J.Neurochem. 41: 256-65 (1983).

ALLISON, L.A. AND SHOUP, R.E. O-Pthalaldehyde derivatives of amines for high speed liquid chromatography electrochemistry. Anal.Chem. 56: 1089. (1984).

ANDERSON, J.M., HUBBARD, B.M., COGHILL, G.R. AND SLIDDERS, W. The effect of advanced old age on the neuron content of the cerebral cortex. J. Neurol Sci. 58:233-244. (1983).

ARMSTRONG, D.M., HERSCH, L.B. AND GAGE, F.H. Morphologic alterations of cholinergic processes in the neocortex of aged rats. Neurobiol Aging, 9:199-205. (1988).

## Bibliografía

---

- ARMSTRONG, D.M., LEROY, S., SHIELDS, D. AND COL. Somatostatine-like immunoreactivity within neuritic plaques. Brain Res. 338: 71-9 (1985).
- AUGUSTINE, G.J., CHARLTON, M.P. AND SMITH, S.J. Calcium action in synaptic transmitter release. Annual Rev. Neurosci. 10: 633-93. (1987)
- AZIZI, F. AND VAGENAKIS, A.G. Pituitary- thyroid responsiveness to intramuscul thyrotropin releasing hormone based on analyses of serum thyroxine, triiodothyromine and thyrotropin concentrations. New Eugl. J. Med.292:173-178. (1975).
- BACHELARD, H.S. Biochemistry of centrally active amino acids. En: Amino acids neurotransmitter. (eds.) F.V. Defeudis y P. Mandel. pp 475-97. Raven Press. New York. (1981).
- BALCAR, V.J. AND JOHNSTON, G.A.R. the structural specificity of high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. J. Neurochem. 19. 2657-66. (1972).
- BANAY-SCHWARTZ, M., LAJTHA, A. AND PALKOVITS, M. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS. Structural Elements I. Glutamate and related amino acid. Neurochem. Res. n-614: 555-62. (1989a).
- BANAY-SCHWARTZ, M., LAJTHA A. AND PALKOVITS, M. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS. Structural Elements II. Taurine and small neutral amino acids. Neurochem. Res. 614: 563-70. (1989b).
- BARBEITIO, L., GIRAULT, J.A., GODEHEN, G., PITTALUGA, A. AND GLOWINSKI, J. Activation of the bilateral corticostriatal glutamatergic projection by infusion of GABA into Thalamic motor nuclei in the cat: an in vivo release study. Neurosci. 28(2): 365-74. (1989).
- BARBER, R.P., VAUGHN, J.E., SAITO, K. AND COL. GABergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. Brain Res. 141: 35-55. (1978).
- BARON, M. AND GALLEGO, A. The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex. Z. Zellforsch. 128:42-57. (1972).
- BARRETT, A.J. Proteinases in the mammalian cells and tissues. (eds).Barret, A.J. North-Holland Biomed. Press., (Amst), (1977).
- BARRETT, A.J. AND Mc DONALD, J.K. Mammalian proteases. Aglossary and bibliography. Vol 1 Endopeptidases. Academic Press London (1980).

- BARTUS, R.T. AND DEAN, R.L. Developing and utilizing animal models in the search for an effective treatment for aged-related memory disturbances. In: Physiological Aging and Dementia. (Ed.) Gottfries, C. Basel: S. Karger Press. pp: 231-67 (1983).
- BARTUS, R.T., DEAN, R.L., BEER, B. AND COL. The cholinergic hypothesis of geriatric memory disfunction. Science. 217: 408-17. (1982).
- BATTAINI, F., GOVONI, S., RIUS, R.A. AND COL. Age-dependent increase in (<sup>3</sup>H)verapamil binding to rat cortical membranes. Neurosci. Lett. 61: 67-71 (1982).
- BATTISTIN, L., GRYNBAUM, A. AND LAJTHA, A. Distribution and uptake of amino acids in various regions of the cat brain in vitro. J. Neurochem. 16: 1459-1468. (1969).
- BAUDRY, M., ARST, D.S. AND LYNCH, G. Increased (<sup>3</sup>H)-glutamate receptor binding in aged rats. Brain Res. 223: 195-8. (1981).
- BAUER, K. Role of proteolytic enzymes in neuropeptide metabolism. INERM 110:475-494. (1982).
- BAVER, K. AND KLEINKAUF, H. Catabolism of thyroliberin by rat adenohipophyreal tissue extract. J: Biochem. 106:107-117. (1980).
- BEAL, M.F. AND MARTIN, J.B. Neuropeptides in neurologic disease. Ann. neurol. 20: 547-65 (1986b).
- BEAL, M.F., UHL, G., MAZUREK, M.F. AND COL. Somatostatine: alteration in the CNS in neurological diseases. In: Neuropeptides in neurologic and psychiatric diseases. (Eds.) Martin, J.B. AND Barchas, J.D. Raven Press, New York. pp: 215-57 (1986a).
- BEAL, M.F., KOWALL, N.W. AND MAZUREK, M.F. Neuropeptides in Alzheimer's disease. J. Neural Transm [Suppl] 24: 163-74 (1987).
- BENEDETTI, M.S., CINI, M., FUSI, P. AND DOSTERT, P. The effects of aging on MAO activity and amino acid levels in rat brain. J. Neural. Transm. 29: 259-68 (1990).
- BENUCK, M. AND MARKS, N. Enzymatic inactivation of substance P by a partially purified enzyme from rat brain. Biochem. Biophys. Res. Comm. 65(1):153-160. (1975).
- BERDICHEVSKY E., RIVEROS N., SANCHEZ-ARMASS, S., AND COL. N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. Neurosci. Lett. 36:75-80. (1983).



## Bibliografía

---

BERG, M.J. AND MARKS, N. Formation of des-tyr-dynorphins 5-17 by a purified cytosolic aminopeptidase of rat brain. J. Neurosc. Res 11:313-321. (1984).

BIANCHI, L. Qualche considerazione sui metodi per il conteggio delle cellule nervose. ANAT. anz. 92:233-240. (1942).

BIGNAMI, A. AND DAHL, D. Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescent study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. J. Comp. Neurol. 153:27-38. (1974).

BISSETTE, G., WIDERLOV, E., WALLEUS, H. AND COL. Alterations in cerebrospinal fluid concentrations of somatostatin-like immunoreactivity in neuropsychiatric disorders. Arch. Gen. Psychiatry. 43: 1148-51 (1986).

BIZIERE, K., COYLE, J.T. AND COOL. Influence of cortico-striatal afferents on striatal Kainic acid neurotoxicity. Neurosci. Lett. 8: 303-10. (1978).

BJORKERUD, S. Isolated lipofuscin granules: A survey of a new field. Adv. Gerontol. Res. 1:257-288. (1964).

BJÖRKLUND, A. AND HÖKFELT, T. Handbook of chemical neuroanatomy. vol.4 Elsevier. New York. (1985).

BJÖRLUND, H., ERIAKSDOTTER-NILSSON, M., DAHL, D., ROSE, G., HOFFER, AND OLSSON, L. Image analysis of GFA-positive astrocytes from adolescence to senescence. Exp. Brain Res. 58:163-170.(1985).

BLOOM, F.E. Neurotransmitters: Past, present and future directions. Faseb J. 2: 32- 41. (1988)

BLUMER, D. AND BENSON, D.F. Personality changes with frontal and temporal lobe lesions. In D. F. Benson and D. Blumer (Ed). Psychiatric Aspects of Neurologic Disease, Grune and Stratton, New York (1975).

BOHLEN, P. AND MELLET, M. Automated fluorimetric amino acid analysis: The determination of proline and hydroxyproline. Anal. Biochem. 94: 313-21. (1979).

BORG, J., BALCAR, V.J., MARK, J. AND MANDEL, P. Characterization of taurine uptake by neuronal and glial cells in culture. J. Neurochem. 32: 1801-6. (1977).

BOURAS, C., VALLET, P.G., HOF, P.R. AND COL. Substance P immunoreactivity in Alzheimer disease: a study in cases presenting symmetric or asymmetric cortical atrophy. Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 4(1): 24-34 (1990).

BOYA, J., CALVO, A.L., CARBONELL, A.L. AND BORREGON, A. Lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. J. Anat. 175:229-236. (1991).

BOYA, J., CALVO, J., AND PRADO, A. The origin of microglial cells. J. Anat. 129:177-186. (1979).

BRADFORD, H.F. AND WARD, H.K. On glutaminase in mammalian synaptosomes. Brain Res. 110: 115-25. (1976).

BRADFORD, H.F. Neurotransmisores: buscadores quimicos de un objetivo. En Fundamentos de Neuroquímica. Editorial Labor, S.A. 148-254. Barcelona. (1988a).

BRECHER, A.S. AND SOBEL, R.E. Studies on ox brain aminopeptidases. J. Biochem 105:641-646. (1967).

BRIZZE, K.R. KLARA, P. AND JOHNSON, J.E. Changes in microanatomy, neurocytology and fine structure with aging. In: Neurobiology of Aging. edited by J.M. Ordy and K.R. Brizze, pp.425-461. Plenum Press, New York And London. (1975).

BRIZZE, K.R., SHERWOOD, N., AND TIMIRAS, P.S. Comparison of cell populations at various depth levels in cerebral cortex of young adult and aged Long-Evans rats. J. Gerontol. 23: 289-297.(1968)

BRIZZEE, K.R., ORDY, J.M. HANSCH, J. AND KAACK, B. Quantitative assesment of changes in neurons and glia cell packing density and lipofuscin accumulation with age in the cerebral cortex in non-human primate (macaca mulatta). En: Neurobiology of Ageing. R.D. Terry and S. Gershon (eds). Raven Press. New York, pp. 229-244.(1976).

BRIZZEE, K.R., AND ORDY, J.M. Age pigments, cell loss and hippocampal function. Mech. Ageing Dev 9:143-162. (1979).

BRIZZEE, K.R. Aging changes in relation to diseases of the neurns system. In: Neurobiology of Aging. (Eds.) J.M. Ordy and K.R. Brizzee. pp: 545-73. Plenum Press, New York (1975).

BRIZZEE, K.R., ORDY J.M. AND BARTUS, R.T. Localization of cellular changes within multimodal sensory regions in aged monkey brain: Possible implications for age-related cognitive loss. Neurobiol. Aging 1:45-52. (1980).

## Bibliografía

---

BRIZZEE, K.R. Quantitative studies on aging changes in cerebral cortex of rhesus monkey and albino rat with notes on effects of prolonged low-dose ionizing irradiation in the rat. Prog.Brain. Res.1:141-160. (1973).

BRIZZEE, K.R., ORDY, J.M., AND KAACK, B. Early appearance and regional differences in intraneuronal and extraneuronal lipofuscin accumulation with age in the brain of a non-human primate (*Macaca mulatta*). J. Gerontol. 29:366-381. (1974).

BRIZZEE, K.R. Gross morphometric analyses and quantitative histology of the ageing brain. En Neurobiology of Ageing. J. M. Ordy and K. R. Brizze (eds). Plenum Press. New York. pp:401-423.(1975).

BRIZZEE, K.R., KAACK, B., KLARA, P. Lipofuscin: Intra and extraneuronal accumulation and regional distribution. En Neurobiology of Ageing. J. M. Ordy and K. R. Brizze (eds). Plenum Press. New York. pp:463-484. (1975).

BRODMANN, K. Vergleichende localisationslehre der grobhirnrinde in ihren prinzipien dargestellt anf grund des zellenbaus. J. A. Barth. Leipzig. (1909).

BRODY, H. The nervous system and aging. In:Aging, Cancer and Cell Membranes, edited by C. Borek, C.M. Fenoglio, and D.W. King, pp. 200-209. Georg Thieme Verlag, Stuttgart and New York. (1980).

BRODY, H. Organization of the cerebral cortex III. A study of aging in the human cerebral cortex. J. Comp. Neurol. 102:511-556.(1955).

BRODY, H. Structural changes in the aging nervous system. In: The Regulatory Role of the Nervous System in Aging. Interdisciplinary Topics in Gerontology. H.T. Blumenthal, ed. Karger Press, Basel, vol.VII, pp.9-21. (1970).

BROMBERG M.B., PENNEY, J.B., STPHENSON B.S. AND YOUNG A.B. Evidence for glutamate as the neurotransmitter of corticothalamic and corticorubral Pathways. Brain Res. 215: 369-74 (1981).

BROWNSTEIN, M.J. Neuropeptides. In: Basic Neurochemistry. Eds. Siegel G. AND COL. \_New York. Raven Press. 287-309. (1989).

BUNGE, R.P. Glial cells and the central mielin sheath. Physiol. Rev. 48:197-251. (1968).

BURBACH, J.P.H., LOEBER, J.G., VERHOEF, J., DE KOET, E.R. AND DE WIED, D. Biotransformation of endorphins by a synaptosomal plasma membrane preparation of rat brain and by human serun. Biochem. Biophys. Res. Commun. 86:1296-1303. (1979).

CAMARGO, A.C.M., RAMACHO-PINTO, F.J. AND GREENE, L.J. Brain peptidases: Conversion and inactivation of kinin hormones. J. Neurochem.19:37-39. (1972).

CAO, D.H., STROLIN, M. AND DOSTERT, P. Age-related changes in glutamine synthetase activity of rat brain liver and heart. Gerontology. 31: 95-100 (1985).

CARLSSON, A. Aging and brain neurotransmitter. In: Platt, D., ed. Funktionsstorungen des Gehirns in Alter. Stuggart: F.K. Schattauer Verlag; pp: 67-81 (1981).

CARLSSON, A. Neurotransmitter changes in the aging brain. Danish Medical Bulletin. 32: 40-3 (1985).

CASTELLANO B., GONZALEZ B., JENSEN M.B., PEDERSEN E.B., FINSEN B.R. AND ZIMMER J. A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. J. Histochem. Cytochem. 39:561-568. (1991).

COBO, M., PORRAS, A. AND MORA, F. Is there a role for NMDA-receptors in mediating self-stimulation of the medial prefrontal cortex in the rat?. Neurosci. Letters. (1988).

COFFEY, J.W. AND DE DUVE, C. J.BIOL. CHEM.243:3255-3263. (1968). Citado en BARRET A.J. (1977).

COLLINS, C.G.S. The rates of synthesis and uptake of Taurine in eight areas of the rat CNS Brain Res. 76: 447-59. (1974).

CONSOLO, S., WANG, J.X., FIORENTINI, F. AND COL. In vivo and in vitro studies on the regulation of cholinergic neurotransmission in striatum hippocampus and cortex of aged rats. Brain Res. 374: 212-8 (1986).

COOPER, J.D.H., OGDEN, G., McINTOSH, J. AND TURNELL, D.C. The stability of the O-Pthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: An investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolum derivatization technique. Analytical Biochem. 142: 98-102. (1984).

CORSELLIS, J.A.N., ALSTON, R.L. AND MILLER, A.K.H. Cell counting in the human brain: traditional and electronic methods. Postgrad. Med. J. 51:722-726 (1975).

COTMAN, C.W. AND IVERSEN, L.L. Excitatory amino acids in the brain focus on NMDM receptors. Trends in Neurosci. 10: 24-30 (1987).

## Bibliografía

---

- COTMAN, C.W. AND PETERSON, C. Aging in the nervous system. En Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical aspects. 4th.Ed., Siegel G., Agranoff B., Alberts R.W., Molinoff P.(eds). Raven Press. New York. pp. 523-540.(1989).
- COTMAN, C.W., IVERSEN, L.L., WATKINS, J.C. AND COL. Special Issue: Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. Trends in Neurosci. 10: 263-301. (1987)
- CRAGG, B.G. The density of synapses and neurons in normal mentally defective and aging human brains. Brain.98:81-90. (1975).
- CRAS, P., KAWAI, M., SIEDLACK, S., AND PERRY, G. Microglia are associated with the extracellular neurofibrillary tangles of Alzheimer disease. Brain Res. 558:312-314. (1991).
- CURCIO, C.A. AND COLEMAN, P.D. Stability of neuron number in cortical barrels of ageing mice. J.Comp. Neurol. 212:158-172.(1982).
- CURTIS, D.R. Glutamic acid: Advances in biochemistry and Physiology. (Eds.) L.J. Filer, S. Grattini, M.R. Kare, W.A. Reynolds AND R.J. Wurtman. pp.163-5. Raven Press. New York. (1979).
- CURTIS, D.R., PHILLIS, J.W. AND WATKINS, J.C. The chemical excitation of spinal neurons by certain amino acids. J. Physiol. (Lond) 150: 656-82. (1960).
- CHALMERS, D.T., DEWAR, D., GRAHAM, D.N. AND COL. Differential alterations of cortical glutamatergic binding sites in senile dementia of Alzheimer type. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 1352-6 (1990).
- CHAN-PALAY, V. AND ASAN, E. Quantitation of catecholamine neurons in the locus coeruleus in huma brains of normal young and olders adults and in depression. J. Comp. Neurol. 287 (3): 357-72 (1989).
- CHAN-PALAY, V., LIN, C.T., PALAY, S., YAMAMOTO, M. AND WU, J.Y. Taurine in the mammalian cerebelum: Demostration by autoradiographic with Htaurine synthesizing enzymes, cysteine-sulfinic acid decarboxylase. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 2695-9. (1982).
- CHEESEMAN, A.J. AND CLARK, J.B. Influence of the malate-aspartate shuttle on oxidative metabolism in synaptosomes. J. Neurochem. 50(5): 1559-65. (1988).
- CHEUNG, H.S. AND CUSHMAN, D.W. A soluble Aspartate aminopeptidase from dog kidney. Biochim. Biophys. Acta 242:190-193. (1971)

- CHOI, D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J. Neurosci. 7: 369-79. (1987).
- CHOI, D.W. AND ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Annu. Rev. Neurosci. 13: 171-82. (1990).
- CHOW, K.L. AND DEWSON, J.H. Numerical estimates of neurons and glia in lateral geniculate body retrograde degeneration. J. Comp. Neurol. 128:63-74. (1966).
- DALTON, M.M., HOMMES, O.R., AND LEBLOND, C.P. Correlation of glial proliferation with age in the mouse brain. J. Comp. Neurol. 134:397-400. (1968).
- DAVID, S.C., BOUCHARD, O., TSATAS AND GIFTCHRISTOS, N. Macrophages can modify the nonpermissive nature of adult mammalian central nervous system. Neuron 5:463-469. (1990).
- DAVID, P.A., LLOYD, B.J., AND MILHORAT, T.H. A comparative ultrastructural study of the choroic plexus of the immature pig. Anat. rec. 176:443-454. (1973).
- DAVIDSON, N. Amino Acids. In An Introduction to Neurotransmission in Health and Disease. (Ed. Riederer P., Kopp N. and Pearson J.) Oxford Medical Publications. pp: 66-78. (1990).
- DAVIES, J.M. AND HIMWISH, W.A. Neurochemistry of the developing and aging mammalian brain. En: Neurobiology of aging. J.M. Ord y K.R: Brizzee (Eds). pp 329-357. (1975).
- DAWSON, R., WALLACE, D.R. AND MELDRUM, M.J. Endogenous Glutamate release from frontal cortex of adult and aged rats. Neurobiology of aging. 10: 665-8. Pergamon Press plc. (1989).
- DAYAN, A.D. Quantitative histological studies on the aged human brain. I Senile plaques and neurofibrillary tangles in "normal" patients. Ann. Neuropathol 16:85-94 (1970).
- DE LEON, M.J., GEORGE, A.E., FERRIS, S.H. AND COL. Positron emission tomography and computed tomography assessments of the aging human brain. J: Computer Assisted Tomography 8:88-94. (1984).
- DE BONI, U. AND CRAPER, D.R. Controlled induction of paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured human neurons by glutamate and aspartate. J. Neurol. Sci. 68: 105-18. (1985).

## Bibliografía

---

DECKER, M.W. The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. Brain Res. Reviews. 12: 423-38 (1987).

DEL RIO-HORTEGA, P. Estudios sobre la neuroglia. La glia de excasas radiaciones (oligodendroglia). Bol. Real. Soc. Espan Hist. Nat. 14:5-122. (1921).

DELESSE, A. Procedé mécanique pour déterminer la composition des roches. Ann. Mines. 13:379-388. (1848).

DEVANY, K.O., AND JOHSON, H.A. 1 Neuron loss in the aging visual cortex of man. J. Gerontol. 35:836-841.(1980).

DIAMON, R.C., JOHNSON, R.E. AND INGHAM, C.A. Morphological changes in the young, adult and aging rat cerebral cortex, hippocampus and diencephalon. Behar. Biol. 14: 163-74 (1975).

DIAMOND, M.C., JOHNSON, R.E. AND GOLD, M.W. Changes in neuron number and size and glial number in the young, adult and ageing rat medial occipital cortex. Behavior. Biol. 20:409-418.(1977).

DICHTER, M.A. AND CHOI, D.W. Excitatory amino acid neurotransmitter and excitotoxins. Curr. Neurol. 9: 1-26. (1989).

DODD, P.R. AND BRADFORD, H.F. Release of amino acid from the maturing cobalt-induced epileptic focus. Brain Res. 111: 377-88.(1976).

DOMINO, E.F., DREN, A.T. AND GIARDINA, W.J. Cambios bioquímicos y de neurotransmisores en el envejecimiento cerebral. En Psicofarmacología. M.A. Lipton, A. Di Mascio y K.F. Killam (eds). Expaxs, Barcelona. pp. 1679-1688. (1982)

DONOGHUE, J.P. AND WISE, S.P. The motor cortex of the rat: Citoarchitecture and microstimulation mapping. J. Comp. Neurol. 212:76-88. (1982).

DONZANTI, A.B. AND YAMAMOTO, B.K. An improved and rapid HPLC-EC for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates. Life Sciences. 43: 913-22 (1988).

DRUCE, D., PETERSON, D., DEBELLEROCHÉ, J. AND BRADFORD, H.F. Differential amino acid neurotransmitters release in rat neostriatum following lesioning of corticostriatal pathway. Brain Res. 247: 303-7. (1982).

DUARA, R., GRADY, R., HAXBY, J. AND COL. Human brain glucose utilization and cognitive function in relation to age. Ann. Neurol. 16: 702-13 (1984).

DUCE, I.R. AND KEEN, P. Selective uptake of 3-H-Glutamine and 3-H-Glutamate into neurons and satellite cells of dorsal root ganglia in vitro. Neurosci. 8: 861-6. (1983).

DUSTIN, P., BRION, J.P. AND FLAMENT-DURAND, J. What's new in the pathology of neuronal cytoskeleton: The significance of neurofibrillary tangles. Path. Res. Pract. 188: 248-253 (1992).

EDMAN, P. AND HENSCHEN, A. En: Determination in protein sequence. (Ed.) S.B. Needleman. pp: 232-279. (Springer-Verlag. Berlin). (1975).

EICHENBAUM, H., CLEGG, R.A. AND FEELEY, A. Reexamination of functional subdivisions of the rodent prefrontal cortex. Exp. Neurol 79:434-451 (1983).

EINARSSON, S. Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and reverse phase in high performance liquid chromatography. J.Chromatography. 348: 213-29.(1985).

ELIAS, H., HENNING, A. AND SCHWARTZ, D.E. Stereology : Applications to biomedical research. Physiol. Rev. 51:158-200. (1971).

ELLIS, S. AND PERRI, M. Pituitary arylamidase and peptidases. J. Biochem. 241:3679-3686. (1966).

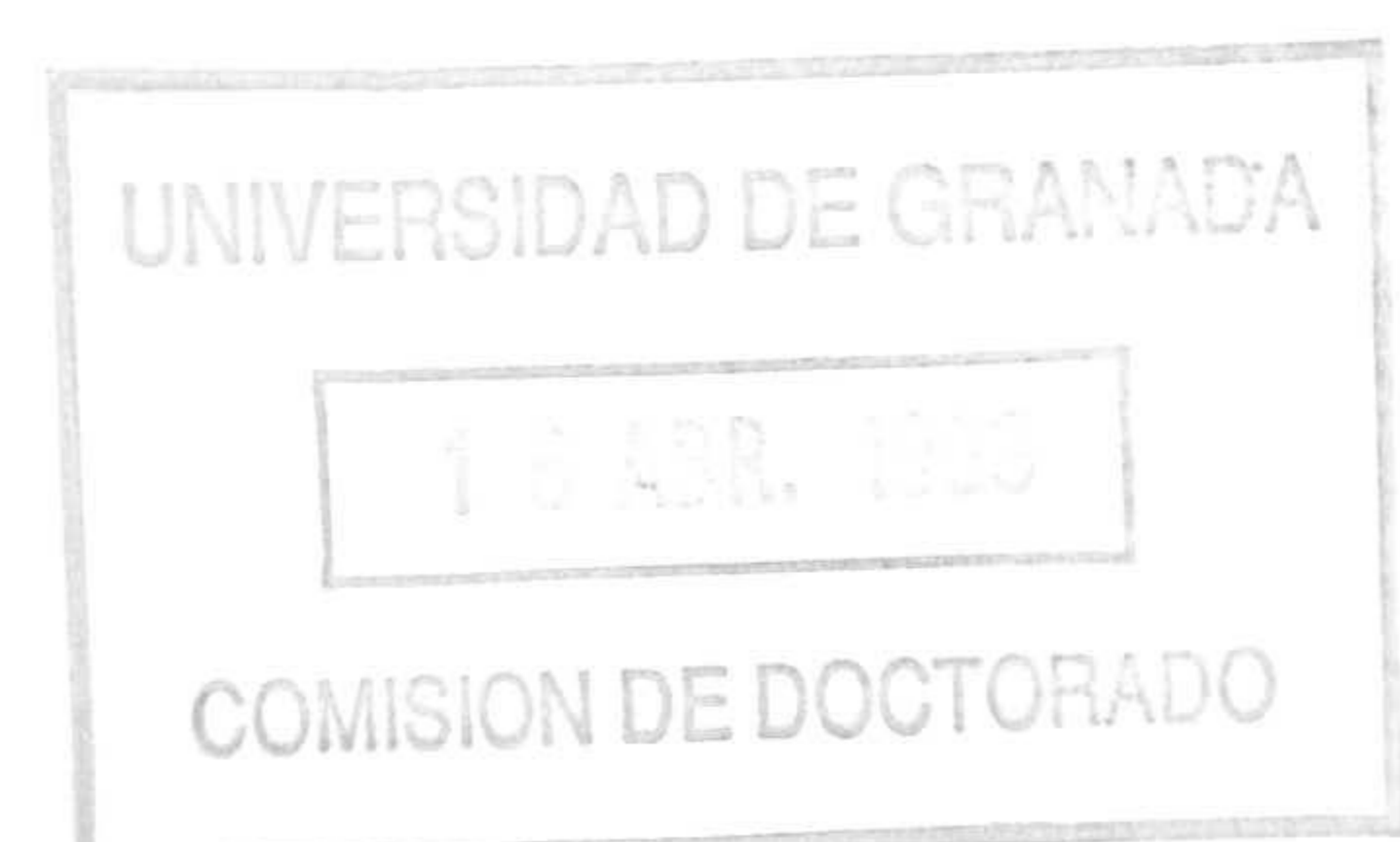
EMERSON, C.H. AND WU,C.F. Thyroid status influences rat serum but not brain TRH pyroglutamyl aminopeptidase activities. Endocrinology 120:1215-1217. (1987).

EMSON , P.C. AND LINDVALL, O. Distribution of putative neurotransmitters in the neocortex. Neurosci. 4: 1-30. (1979).

ENNA, S.J. AND STRONG, R. Age-related alterations in CNS receptor binding. En: Brain neurotransmitters and receptors in aging and aged-related disorders. Aging 17 S.J. Enna, T. Samorajski AND B. Beer (eds.) pp. 133-42. Raven Press. New York. (1981).

ESCOBAR, A., SAMPEDRO, E.D. AND DOW, R.S. Quantitative data on the inferior olivary nucleus in man, cat and vampire bat.J. Comp. Neurol. 132:397-404. (1968).

FAGAN, A.M. AND GAGE, F.H. Cholinergic sprouting in the hippocampus: A proposed role for Il-1. Exp. Neurol. 110:105-120. (1990).





## Bibliografía

---

- FAGG, G.E. AND FOSTER, A.C. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. Neurosci.9: 701-19. (1983).
- FAGG, G.E. AND LANE, J.D. The uptake and release of putative amino acid neurotransmitters. Neurosci. 4: 1015-36 (1979).
- FAIVRE-BAWMAN, A., ROSSIER, J., AND BENDA, P. Glutamate accumulation by a clone of glial cells. Brain Res.76:371-375. (1974).
- FARRANT, M. AND WEBSTER, R.A. Compartmental distribution of endogenous amino acids in the substantia nigra of the rat. Brain Res. 480(1-2): 344-8. (1989).
- FELGENHAUER, K. AND GLENNER, G.G. The enzymatic hydrolysis of amino acid  $\beta$ -naphthylamides. II. Partial purification and properties of a peptide-bound cobalt-activated rat kidney aminopeptidase. J! Histochem. Cytochem. 14:401-413. (1966).
- FERRER, I. AND SARMIENTO, J. Nescent microglia in the developing brain. Acta Neuropathol (Berl.) 50:61-67. (1980).
- FLETCHER, E.J. AND LODGE, D. Excitatory amino acids as neurotransmitters. In An Introduction to Neurotransmission in Health and Disease. (Ed. Riederer P., Kopp N. and Pearson J.) Oxford Medical Publications. pp: 79-89. (1990).
- FLODERUS, S. Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hipophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. Munksgaard. Kopenhagen. (1944).
- FONNUM, F. Glutamate: A neurotransmitter in the mammalian brain. J.Neurochem. 42: 1-11. (1984).
- FORNIELES, F. Aminoácidos neurotransmisores y envejecimiento: Estudio de niveles endógenos en la corteza prefrontal y temporal de la rata. Tesis de Licenciatura en Medicina. Universidad de Granada, (1986).
- FRANCIS, P.T., PALMER, A.M., SIMS, N.R. AND COL. Neurochemical studies of early-ons AND COLzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 313: 7-11 (1985).
- FRANDSEN, A. AND SCHOUSBOE, A. Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. Int. J. Devl. Neuroscience. 8: (2), 209-16 (1990).
- FREEMAN, G.B. AND GIBSON, G.E. Selective alteration of mouse brain neurotransmitter release with age. Neurobiol. Aging. 8: 147-52 (1987).

FREEMAN, G.B. AND GIBSON, G.E. Dopamine, acetylcholine and glutamate interactions in aging: Behavioural and neurochemical correlates. Ann. New York Acad. of Sciences. pp: 191-201 (1988).

FRIEDMAN, T.C. AND WILK, S. The effect of inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase on TRH degradation in rat rerum. Biochem. Biophys. Res. Commun.132:787-794. (1985).

GAGE, F.H. AND BJORKLUND, A. Cholinergic septal grafts into the hippocampal formation improve spatial learning and memory in aged rat an atropine-sensitive mechanism. J. Neurosci.6:2837-2847. (1986).

GASPAR, P. AND BERGER, B. Systemes monoaminergiques. En: La Maladie D'Alzheimer. (Eds.) O. Guard et B. Michel. Medsi/McGraw-Hill. Paris. pp: 246-54 (1989)

GEHRMANN AND KREUTZBERG, G.W. Characterisation of two new monoclonal antibodies directed against rat microglia. J. Comp. Neurol.313:409-430. (1991).

GHANDOURM, M.S., VINCENDON, G., AND GOMBOS G. Astrocyte and oligodengdrocyte distribution in adult rat cerebellum: a immunohistological study. J. neurocytol. 9:637-646. (1980).

GLEES, P. AND HASAN, M. Lipofuscin in neuronal aging and diseases. Norm. Pathol. Anat. 32:1-68. (1976).

GIORGI, O., DEMONTIS, G., PORCEDDU, M.L. AND COL. Developmental and age related changes in D<sub>1</sub>-dopamine receptors and dopamine content in the rat striatum. Brain Res. 35: 283-90 (1987).

GOBERNADO, J.M. Demencias tratables. En Tratado de Medicina Interna. Medicine. pp. 2573-2581.Ed Idepsa, Madrid. (1986).

GODEFROY, F., BASSANT, M.H., WEIL-FUGAZZA, J. AND COL. Age-related changes in dopaminergic and serotonergic indices in the rat forebrain. Neurobiology of aging. 10: 187-90 (1988).

GODUKHIN, O.V., ZHARIKOVA, A.D. AND NOVOSELOV, V.I. The released of labeled L-Glutamic acid from rat neostriatum in vivo following stimulation of frontal cortex. Neurosci. 5: 2151-4. (1980).

GOLDMAN, J.E. AND YEN, S.H. Cytoesqueletal protein abnormalities in neurodegenerative diseases. Am. Neurol 19:209-223. (1986).

## Bibliografía

---

GREENFIELD, S.A. AND SHAW, S.G. Release of acetylcholinesterase and aminopeptidases in vivo following infusion of amphetamine into substantia nigra. Neuroscience 7:2883-2893. (1982).

GREENMYRE, J.T. AND YOUNG, A.B. Excitatory amino acids an Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging. 10: 593-602. (1989).

GREGERMAN, R.I. AND DAVIS, P.J. Effects of intrinsic and extrinsic variables on thyroid hormone economy. Intrinsic physiological variables and nonthyroidal illness. En: The Thyroid. Eds. Werner and Ingbar. Harper and Row . New York. pp. 223-246. (1978).

GREGERSON, K.A. AND SELMANOFF, M. Changes in the kinetics [<sup>3</sup>H] dopamine release from median eminence and striatal synaptosomes during aging. Endocrinology 126:228-234. (1990).

GRIFFIN, R., ILLIS, L.S., AND MICHELL J. Identification of neuroglia by light and electron microscopy. Acta Neuropathol. (Berl.) 22:7-12. (1972).

GUIMARES, J.A., BORGES, D.R., PRADO, E.S. AND PRADO, J.L. Kininconverting aminopeptidase from human serum. Biochem. Pharmacol. 22:3157-3172. (1973).

GUNAWAN, S., WALTON, N. AND TREIMAN, D.M. High-performance liquid chromatographic determination of selected amino acids in rat brain by precolum derivatization with phenylisothiocyanate. Journal of Chromatography. 503: 177-87 (1990).

HABLITZ, J.J. AND LANGMOEN, I.A. Excitation of hippocampal pyramidal cells by glutamate in the guinea pig and rat. J. Physiol. 325: 317-31. (1982).

HAGINAKA, J. AND WAKAI, J. Automated precolum derivatization of amino acids with o-phthalaldehyde using a hollow-fibre membrane reactor. Journal of Chromatography. 502: 317-24 (1990).

HAJOS, F., KALMAN, N., ZILLES, K., SLEICHER, A. AND SOTONY, P. Remote astrocytic response as demonstrated by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry in the visual cortex of dorsal lateral geniculate nucleus lesioned rats. Glia 3:301-310. (1990).

HALDEMAN, S. AND MCLENNAN, H. The action of two inhibitors of glutamic acid uptake upon amino acid induced and synaptic excitations of thalamic neurones. Brain Res. 63: 123-9. (1973).

HALL, R.D. AND LINDHOLM, E.P. organization and motor somatosensory neocortex in the albino rat. Brain. Res.66:23-38. (1974).

- HAMBERGER, A., COTMAN, C.W., SELLSTRÖM, A., AND WEILER, C.T. Glutamine, glial cells and their relationship to transmitter glutamate. En Dynamic Properties of Glia Cells. Schoffeniels E., Frank G., Hertz L. Tower D.B. (Eds). pp:163-172. Pergamon Press. Oxford. (1978).
- HAMMARBERG, C. Studien über klinik und pathologie der idiotie. Upsala. (1895).
- HAN, Z., KUYATT, B.L., KOCHMAN, K.A. AND COL. Effect of aging on concentration of D<sub>2</sub>-receptor-containing neurons in the rat striatum. Brain Res. 498 (2): 299-307 (1989).
- HANSEN, L.A., ARMSTRONG, D.M. AND TERRY, R.D. An immunohistochemical quantification of fibrous astrocytes in the aging human cerebral cortex. Neurobiology of Aging 8:1-6 (1987).
- HARDY, J., COWBURN, R., BARTON, A. AND COL. Region-specific loss of glutamate innervation in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 73: 77-80 (1987).
- HARDY, J.A., ADOLFSSON, I., ALAFUZOFF, G., BUCHT, J., MARCUSSON, P., NYBERG, E., PENDALL, P., WESTER, P., AND WINBLAD, B. Transmitter deficits in Alzheimer's disease. Neurochem Int. 7:545-563.(1985).
- HARIK, S.I. AND McCracken, K.A. Age-related increase in presynaptic noradrenergic markers of the rat cerebral cortex. Brain Res. 381: 125-30 (1986).
- HATTORI, T., FIBIGER, H.C. AND McGEER, P.C. Demonstration of a pallidonigral projection innervating dopaminergic neurons. J. Comp. Neurol. 162: 487-504. (1975).
- HAUG, H., BARMWATER, U., EGGERS, R., FISHER, D., KÜHL, S., AND SASS N.L. Anatomical Changes in Ageing Brain: Morphometric Analysis of the Human Prosencephalon. En Brain Ageing: Neuropathology and Neuropharmacology (Ageing, Vol 21). J. Cervós-Navarro and H.I. Sarkander (Eds). Raven Press. New York. pp:1-12. (1983).
- HAUG, H., KÜHL, S., MECKE, E., SASS, N.L., AND WASNER K. The significance of morphometric procedures in the investigation of age changes in citoarchitectonic structures of human brain. J. Hirnforsh. 25:353-374. (1984).
- HAUG, H. Macroscopic and microscopic morphometric of the human brain and cortex. A survey in the light of new results. Brain Pathol 1:123-149. (1984).
- HAUG, H. Stereological methods in the analysis of neuronal parameters in the central nervous system. J. of Microscopy 95:165-180. (1972).

## Bibliografía

---

- HAYASHI, M., HAYASHI, R., TANII, H., HASHIMOTO, K. AND PATEL, A.J. The influence of nerve cells on the development of astrocytes. Dev. Brain. Res. 41:37-42. (1988).
- HAYASHI, M. AND OSHIMA, K. Purification and characterization of aryamidase from monkey brain. J. Biochem. 81 :631-639. (1977).
- HAYASHI, M. Monkey brain aryamidase. II. Further characterization and studies on mode of hydrolysis of physiological active peptides. J. Biochem. 84:1363-1372. (1978).
- HAZUN, E., CHANG, K. AND CUATRECASAS, P. Rapid degradation of (3H)- leucine-eukephalin by intact neuroblastoma cells. Life Sci 24:1327-1344. (1979).
- HEADHCOTE, J.C., AND DAVIES, D.M. Improved technique for the analysis of amino acids and related components on thin layer cof cellulose. IV. Quantitative determination of amino acid in urine. J. Chromatogr. 55: 377-81. (1971).
- HENDERSON, G., TOMLINSON, B.E. AND GIBSON, G.H. Cells counts in human cerebral cortex in normal adults throughout life using and imagen analizing computer. J. Neurol. Sci. 46:113-136. (1980).
- HENN, F.A., GOLDSTEIN, M.N., AND HAMBERGER, A. Uptake of the neurotransmitter candidate glutamate by glia. Nature 249:663-664. (1974).
- HERSH, L.B. AND McKELVY, J.F. An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. J. Neurochem. 36:171-178. (1981).
- HERTZ, L., SCHOUSBOE, A., AND FEDOROFF, S. Glutamate uptake, metabolism and release in cultured normal astrocytes. Trans. Am. Soc. Neurochem. 8:206 (1977).
- HERTZ, L. Functionals interactions between neurons and astrocytes. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. Prog. Neurobiol. 13: 277-323. (1979).
- HICKEY, W.F. AND KIMURA, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow derived and present antigen in vivo. Science 239:290-292. (1988).
- HILL, D.R., BOWERY, N.G. AND HUDSON, A.L. Inhibition of GABA receptor binding by guanylnucleotides. J. Neurochem. 42: 652-57. (1984).
- HINDS, J.W. AND McNELLY, N.A. Dispersion of cisternate of rough endoplasmic reticulum in aging CNS neurons: A strictly linear trend. Am. J. Anat. 152: 433-9 (1978).

HINDS, J.W., AND McNELLY, N.A. Aging of the rat olfactory bulb: Growth and atrophy of constituent layers and changes in size and number of mitral cells. J. Comp. Neurol. 171:345-368. (1977).

HINDS, J.W., AND McNELLY, N.A. Aging in the rat olfactory system: Correlation of changes in the olfactory epithelium and olfactory bulb. J. Comp. Neurol. 203:441-454. (1981).

HORSTHEMKE, B., LEBLANC, P., KORDON, C., WATTIAUX-DE CONINCK, S., WATTIAUX, R. AND BAVER, K. Subcellular distribution of peptide-bound neutral peptidases capable of hydrolyzing gonadoliberin, thyroliberin, eukephalin and substance P. Eur. J. Biochem. 139:315-320. (1984).

HORVATH, T.B. AND DAVIS, K.L. Central nervous system disorders in aging. En: Biology of Aging. 3<sup>a</sup>edic. Schneider, E.L. and Rowe, J.W.(Eds). Academic Press, Inc. New York. (1990).

HOUSER, C.R., CRAWFORD, G.D., SALVATERRA, P.M., AND VAUGHN, J.E. Cholinergic neurons in rat cerebral cortex identified by immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. Soc. Neurosci. Abstr. 9:80 (1983).

HSU, H.K., AND PENG, M.T. Hypothalamic neuron number of old female rats. Gerontology 24:434-440. (1978).

HUME, D.A., PERRY, V.H. AND GORDON, S. The immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina. Phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. J. Cell. Biol. 97:253-257. (1983).

HUTTENLOCHER, P.R. Synaptic density in human frontal cortex-developmental changes and effects of aging. Brain Res 163:195-205. (1979).

IMAMOTO, K., PATERSON, J.A., AND LEBLOND, C.P. Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. I. Sequential changes in oligodendrocytes. J. Comp. Neurol 180:115-138. (1978).

IMAMOTO, K., AND LEBLOND, C.P. Presence of labeled monocytes, macrophages and microglia in association with a stab wound of the brain after and injection of bone marrow cells labeled with <sup>3</sup>H-uridine into rat. J. Comp. Neurol. 174:255-280. (1977).

INAGAKI, N., FUKUI, H., ITO, S. AND WADA, H. Type-2-astrocytes show intracellular Ca elevation in response to various neuroactive substances. Neurosci. Letters 128:257-260. (1991).

## Bibliografía

---

IRIBAR, C., RAMIREZ, M., CASIS, L. AND ALBA, F. Separation of three different Glutamyl-aminopeptidase isoenzymes from rat brain. Neurosci. Lett. (Suppl). 18:332. (1984).

ISHIMARU, H., OGAWA, S., FUJI, K., FUKUTA, T, KAMEYAMA, T., AND NABESHIMA, T. Aged-related changes in learning and memory, choline acetyltransferase activity and number of neuronal cells in rats. J. Pharmacobio-Dyn. 14: 321-325. (1991).

IVERSEN, L.L. Psicofarmacologia bioquímicas del GABA. En: Psicofarmacologia. Eds. Lipton AND COL. pp 57-71. Raven Press. Barcelona, 1982.

JACQUE, C.M. La proteine gliofibrillaire acide. La presse Médicale 20/29:1384-1390. Masson. París (1991)

JANCSO G., KARCSU S., KIRALY E. AND COL. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. Brain Res. 295: 211-6. (1984).

JOHNSON, R.J. Anatomy of the aging nerve cell. In: Handbook of Cell Biology of Aging. V.J. Cristafalo, ed, CRC Press, Boca Raton, pp.149-178. (1985).

JOHNSTON, M.V., MCKINNEY, M., AND COYLE, J.T. Neocortical cholinergic innervation: A description of extrinsic and intrinsic components in the rat. Exp. Brain Res. 43:159-172. (1981).

JOHSTON, G.A.R. AND COL. Potentiation of L-glutamate and L-aspartate excitation of cat spinal neurons by the estereoisomers of threo-3-hydroxyaspartate. J. Neurochem. 34: 241-3. (1980).

JONES, D.C. Development, maturation and aging of synapses. En Advances in Cellular Neurobiology. 4:163-221, Academic Press, Inc.(1983).

JORDAN, F.L. AND THOMAS, W.E. Brain macrophages: question of origen and interrelationship. Brain Res.Rev. 13:165-178. (1988).

JORGENSEN, O. AND COL. Amino acid excretion sin urine of normal. Clim. Chem.17: 16-8. (1970).

KANEKO, T., SHIGEMOTO, R. AND MIZUNO, N. Metabolism of glutamate and ammonia in astrocyte : an inmunocytochemical study. Brain. Res 457:160-164. (1988).

KANIA, R.K., SANTIAGO, N.A. AND GRAY, G.M. Intestinal surface amino-oligopeptidases. II. Substrate kinetics and topography of the active site. J. Biol. Chem. 252:4929-4934. (1977).

KATZMAN, R. AND THAL, L.J. Neurochemistry of Alzheimer disease. En Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical aspects. 4th.Ed., Siegel G., Agranoff B., Alberts R.W., Molinoff P.(eds). Raven Press. New York. pp. 827-838.(1989).

KATZMAN, R. Normal aging and the Brain. News In Physiological Sciences. 3:197-200 (1988).

KELLY, J.A., NEIDLE, E.L. AND NEIDLE, A. An aminopeptidase from mouse brain cytosol that cleaves N-terminal acidic amino acid residues. J. Neurochem. 40:1727-1733. (1983).

KELLY, J.S., AND DICK, F. GABA of glial cells of the peripheral and central nervous system. En Dynamic Properties of Glia Cells. Schoffeniels E., Frank G., Hertz L. Tower D.B. (Eds). pp:183-192. Pergamon Press. Oxford. (1978).

KEMPER, T.L. Neuroanatomical and neuropathological changes in normal aging and in dementia. En The Clinical Neurology of Aging. M. L. Albert, (Ed). Oxford University Press, London pp.9-52.(1984).

KENNY, J. Cell surface peptidases are neither peptide-non organ specific. Tibs pp.40-42. (1986).

KIM, J.P. AND CHOI, D.W. Quinolate neurotoxicity in cortical cell culture. Neuroscience. 23: 423-32. (1987).

KIM, J.P., KOH, J. AND CHOI, D.W. L-Homocysteate is a potent neurotoxin on cultured cortical neurons. Brain Res. 437: 103-19. (1987).

KISH, S.J., MUNIR, E.A., SCHUT, L. AND COL. Cognitive deficits in olivopontocerebellar atrophy: Implications for the cholinergic hypothesis of Alzheimer's dementia. Ann. Neurol. 24: 200-6 (1988).

KNOX, C.A. AND OLIVEIRA, A. Brain aging in normotensive and hypertensive strains of rats. III. A quantitative study of cerebrovasculature. Acta Neuropathol. 52:17-26. (1980).

KOH, J. AND CHOI, D.W. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: Differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. J. Neurosci. 8: 2153-63. (1988a).

KOH, J. AND CHOI, D.W. Cultured striatal neurons containing NADPH-diaphorase or acetylcholinesterase are selectively resistant to injury by NMDA receptor agonists. Brain Res. 446: 374-8. (1988b).



## Bibliografía

---

KOLB, B. AND TAYLOR, L. Affective behavior in patients with localized cortical excision: role of lesion site and side. Science 214:89-91 (1981).

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. Brain. Res. Rev. 8:65-98. (1984).

KONIGSMARK, K.W. Methods for the counting of neurons. En Contemporary Research Methods in Neuroanatomy. Nauta W.J.H. and Ebenson S.O.E. (Eds). Springer. Heidelberg-Berlin-New York. pp:313-340 (1970).

KONIGSMARK, B.W. AND SIDMAN, R.L. Origin of brain macrophages in the mouse. J. Neuropath. Exp. Neurol. 22:643-676. (1963).

KORR, H. Combination of metallic impregnation and autoradiography of brain sections. A methods for differentiation of proliferating glial cells in the brain of adult rat and mice. Histochemistry 59:111-116. (1978).

KORR, H. Proliferation of different cells types in the brain. Adv. Anat. Embriol. Cell. Biol. 61:1-72. (1980).

KOSHIYA, K., OKADA, M., IMAI, K., KATOT., TANAKA, R. HATANKA, M. AND KATOT. Localization of angiotensin converting enzyme prolyl endopeptidase and other peptidase in cultured neuronal or glial cells. Neurochem. Int 7:125-130. (1985).

KOSAKA, T., HEIZMANN, C.W. AND BARNSTABLE, C.J. Monoclonal antibody VC1.1 selectively stains a population of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat cerebral cortex. Exp. Brain Res. 78: 43-50. (1989).

KRETTEK, J.E., AND PRICE, J.L. The cortical projection of the mediodorsal and adjacent thalamic nuclei in the rat. J. Comp. Neurol. 171:157-192.(1977a).

KRIEG, W.J.S. Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. A. Topography of the cortical areas. J. Comp. Neurol. 84:221-275. (1946a).

KRISCHKE, H., LANGER, J., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S., BOHLEY, P. AND HANSON, H. Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. Acta Biol. Med. Ger. 36:185-199. (1977).

KRUGER, L., AND MAXWELL, D.S. Electron microscopy of oligodendrocytes in normal rat cerebrum. Am. J. Anat. 118:411-435. (1966).

- KUDO, Y. AND OKA, J. The role of calcium ion in the L-glutamate induced depolarization in the frog spinal cord. Comp. Biochem. Physiol. 72: 231-6. (1983).
- KUYPERS, H.G.J.M. Anatomy of the descending pathways In V. B. Brooks (Ed). The Nervous System, Handbook of Physiology 2:597-666. (1981).
- KVAMME, E. AND OLSEN, B.E. Substrate mediated regulation of phosphate activated glutaminase in nervous tissue. Brain Res. 181: 228-33. (1980).
- LAI, H., BOWDEN, D.M AND HORITA, A. Age-related decreases in dopamine receptors in the caudate nucleus and putamen of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Neurobiol. Aging. 8 (1): 45-9 (1987).
- LANDFIELD, P.W., ROSE, G., SANDLES, L., WOHSTADTER, T.C., AND LYNCH, G. Patterns of astroglial hypertrophy and neuronal degeneration in the hippocampus of aged memory deficient rats. J. Gerontol., 32:3-12.(1977).
- LANG, W. AND HENKE, H. Cholinergic receptor and autoradiography in brains of non-neurological and senile dementia of Alzheimer type patients. Brain Res. 267: 271-80 (1983).
- LANGLEY, O.K., AND GHANDOUR, M.S. An immunocytochemical investigation of non-neuronal enolase in cerebellum: A new astrocyte marker. Histochem. J. 13:137-148. (1981).
- LANGLEY, O.K., GHANDOUR, M.S., VINCENDON, G., AND GONBOS, G. Carbonic anhydrase: An ultrastructural study in rat cerebellum. Histochem. J. 12:473-483. (1980).
- LAWSON, L.J., PERRY, V.H., DRI, P., AND GORDON, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience 39: 151-170. (1990).
- LEONARD, C.M. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the medio dorsal nucleus. II. Efferent connections. Brain Res. 12:321-343.(1969).
- LEWIS, P.R. AND SHUTE, C.C.D. The cholinergic limbic system: Projection to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. Brain. 90:521-542. (1967).
- LINDSAY, R.M. Reactive gliosis. in: Astrocytes,3:231-262.S.Fedoroff and A. Vernadakis, eds.Academic Press,New York. (1986).

## Bibliografía

---

LING, E.A., PENNEY, D., AND LEBLONB, C.P. Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursor of the "amoeboid cells" present in the corpus callosum of postnatal rats. J. Comp. Neurol. 193:631-657. (1980).

LING, E.A., KAUR, C. AND WONG, W.C. Expression of major histocompatibility complex antigens and CR3 complement receptors in activated microglia following an injection of ricin into the sciatic nerve in rats. HISTOL HISTOPATH 7:93-100. (1992).

LING, E.A. AND LEBLOND, C.P. Investigation of glial cells in semithin section. II Variation with age in the numbers of the various glial cells types in rat cortex and corpus callosum. J. Comp. Neurol. 149:73-82.(1973).

LING, E.A. The origin and nature of microglia. En Advances in Cellular Neurobiology Vol II. Fedoroff S. y Hetz L. (Eds). pp:33-82. Academic Press. New York. (1981).

LING, E.A., PATERSON, J.A., PRIVAT, A., MORI, S., AND LEBLONB, C.P. Investigation of glial cells in semithin sections. I. Identification of glial cells in the brain of young rat. J. Comp. Neurol. 149:43-62. (1973).

LING, E.A. Transformation of monocytes into amoeboid microglia and into microglia in the corpus callosum of newborn rat as shown by labeling monocytes by carbon particles. J. Anat. 128:847-858. (1979).

LJUNGDAHL, A. AND HOEKFELT, T. Autoradiographic uptake patterns of <sup>3</sup>H- GABA & <sup>3</sup>H-Gly in CN tissue with special reference to the cat spinal cord. Brain Res. 62: 587-95. (1973).

LUIJTELAAR, J., WOUTERLOOD, F.G; TONNAER, J.A.D. AND STEINBUSCH, H.W.M. Ultrastructure of aberrant serotonin-immunoreactive fibers in the caudate putamen complex of the aged rat. Sinapse 8:162-168. (1991).

LYNCH, G. AND BAUDRY, M. The biochemistry of memory: A new and specific hypothesis. Science, 224: 1057-63. (1984).

MA, K.C., CHANG, Z.H., SHIH, H., ZHU, J.H. AND WU, J.Y. The compensatory rebound of reactive astrogliosis: glial fibrillary acidic protein immunohistochemical analysis of reactive astrogliosis after a puncture wound to the brain of rats with portocaval anastomosis. Acta Neuropathol 82:72-77. (1991).

MacDERMOTT, A.B., MAYER M.L., WESTBROOK G.L. AND COL. NMDA receptors activation increased cytoplasmic Ca<sup>++</sup> concentration in cultured spinal cord neurones. Nature 321: 519-22. (1986).

- MANDEL, P., ROUSSEL, G., DELAUNCY, J.P., AND NUSSBAUM, J.L. Wolfram protein, oligodendroglial cell and myelin markers, carbonic anhydrase C, a glial marker. En Dynamic Properties of Glia Cells. Schoffeniels E., Franck G., Hertz L., Tower D.B. (Eds). pp:267-274. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt (1978).
- MANN, D.M.A. AND YATES, P.O. Neurotransmitter deficits in Alzheimer's disease and in Down's and in others dementing disorders. Human Neurobiol.5:147-158.(1986).
- MANN, D.M.A., YATES, P.O., AND MARCINIUK B. A comparison of nerve cells loss in cortical and subcortical structures in Alzheimer disease. J. Neurosurg Psychiat 49:310-312.(1986).
- MANN, D.M.A., AND YATES, P.O. Lipoprotein pigment their relationship to aging in the human nervous system. I. The lipofuscin content of nerve cells. II. The melanin content of pigmented nerve cells. Brain,97:481-498. (1964).
- MARAGOS W.F., GREENAMYRE J.T., PENNEY J.B. AND COL. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: An hypothesis. Trends Neurosci. 10: 65-8. (1987b).
- MARKS, N. AND STERN, F. Inactivation of somatostatin (GH-RIH) and its analogs by crude and partially purified rat brain extracts. Febs. Lett 55 (1975).
- MARKS, N. DATTA, R.K. AND LAJTHA, A. Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. J. Biol. Chem. 243:2882-2889. (1968a) .
- MARKS, N. AND LAJHA, A. Developmental changes in peptide-bound hydrolases. En: Protein metabolism of the Nervous System. A. Lajtha, Ed. Plenum Press, New York. (1973).
- MARKS, N., DATTA, R.K. AND LAJHA, A. The relationship of aminopeptidase and arylamidase to protein breakdown in the brain. En: Macromolecules and function of the neurone. Z. Lodin, Ed. Excerpta Medica, Amsterdam, (1968b).
- MASUOKA, D.T., JONSSON, G., AND, FINCH, C.E. Aging and unusual catecholamine-containing structures in the mouse brain. Brain Res,169:335-341. (1979).
- MATHEWSON, A.J. AND BERRY, M. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. Brain Res.327:61-69. (1985).
- MATSUMOTO, H. AND COL. Aged related changes in the glu metabolism of cerebral cortical slices from rats. Neurochemical Res 7:679-685. (1982).

## Bibliografía

---

MATTHEISSEN, H.P., SMALENBACH, C. AND MÜLLER, H.W. Astroglia- released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons in associated with laminin bound in a sulphated complex and free fibronectin. Glia 2:177-188. (1989).

MATURANA, H.R. The fine anatomy of the optic nerve of anurans. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7:107-120. (1960).

MAYER, M.L. AND WESTEBROOK, G.L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate CNS. Progr. Neurobiol. 28: 197-296. (1987)

McDONALD, J.K. AND SCHWABE, C. Intracellular exopeptidases. En: Proteinases in mammalian cells tissues. A.J.Barret Ed. North-Holland Biomed. Press. pp. 311-386. (1977).

McEVOY, P. AND COL. Detection of amino acid in 0.1 ml. of blood plasma. Clin. Chem. 12: 144-9 (1966).

McGEER, P.L. AND McGEER, E.G. Amino Acid Neurotransmitters. In Basic Neurochemistry. Eds. G.I. Siegel AND COL. pp 311-32. New York. Raven Press. (1989)

McGEER, P.L., ECCLES, J.C. AND McGEER, E.C. Molecular Neurobiology of Mammalian Brain. New York. Plenum Press. pp 149-224, 553-94. (1987).

McGEER, P.L. The 12th J. A.F. Stevenson Memorial Lecture. Aging, Alzheimers's disease and the cholinergic system. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62: 741-54 (1984).

McGEER, P.L., MC, GEER, G.G., AND SUZUKI, J.S. Ageing and extrapiramidal funtion. Arch. Neurol. 34:33-35. (1977).

McGEER, P.L. AND McGEER, E.G. Neurotransmitters in the aging brain. En: The molecular basis of neuropathology. A.N. Davison y R.H.S. Thomson (Eds.) pp 631-48., Edward Arnould. London. (1981a).

McINTOSH, H.H. AND WESTFALL, T.C. Influence of aging on catecholamine levels, accumulation, and release in F-344 rats. Neurobiol. Aging. 8 (3): 233-9 (1987).

McLAUGHLIN, B.I. AND COL. The fine structural localization of glutamate decarboxylase in synaptic terminals of rodent cerebellum Brain Res. 76: 377-91. (1974).

McLENNAN, H. The effect of decortication on the excitatory amino acids sensitivity of striatal neurones. Neurosci. Lett. 18: 313-6. (1980).

MEEKER, R. AND MYERS, R.D. In vivo <sup>14</sup>C-amino acid profiles in discrete hypothalamic regions during push-pull perfusion in the unrestrained rat. Neurosci. 4: 495-506. (1979).

MESULAM, M., AND GEULA, C. Acetylcholinesterase-rich pyramidal neurons hippocampus: Absence at birth, development during span life and dissolution in Alzheimer disease. Ann. Neurol. 24:765-773. (1988).

MEYER, E.M., ONGE, E. AND CREWS, F.T. Effect of age on rat cortical presynaptic cholinergic processes. Neurobiol. Aging 5: 315-7 (1984).

MILNER, B. Some effects of frontal lobectomy in man. In J.M. Warren and K. Akert (Eds). The Frontal Granular Cortex and Behavior, McGraw-Hill, New York (1964).

MIQUEL, J. Envejecimiento y ciencia ficción. Mundo Científico 7:794-804. (1981).

MIQUEL, J., JONSSON, G. AND CERVOS-NAVARRO, J. Comparison of CNS aging in humans and experimental animals. Aging 21:231-258. (1983).

MIYAZONO, M., IWAKI, T. AND TATEISHI, J. A comparative immunohistochemical study of kuru and senile plaques with a special reference to glial reactions at various stages of amyloid plaque formation. A Journal of Pathology 139.(3). (1991).

MOLLER, S.E. A method for the separation of plasma amino acid by ion-exchange chromatography combined with a semiautomated computation of plasma amino acid concentration. J.Chromatography. 104: 63-72. (1975).

MONAGHAN, D.T., BRIDGES, R.J. AND COTMAN, C.W. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29:365-402. (1989).

MORA, F., PEINADO, J.M. AND MYERS, R.D. Amino acids profiles in cortex of conscious rat: Recent studies & future perspectives. En Neurochem. Analys. Conci. Brain: Voltam. & Push-Pull Perf. R.D. Myers & P. Knott Eds. Ann. N.Y. Acad. Sci. 473. pp. 461-74. 1986

MORA, F. Effects of age on amino acid neurotransmitters. En: Changes in Receptors Responses and Neurotransmitters with Age. Amer. Physiol. Soc. (1988).

MORGAN, D.G., MAY, P.C., AND FINCH, C.E. Dopamine and serotonin systems y human and rodent brain: Effects of ageing and neurodegenerative diseases. J. Am. Gerontol. Soc. 35:334-345. (1987).

## Bibliografía

---

MORI, S. AND LEBLOND, C.P. Electron microscope identification of three class of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. J. Comp. Neurol. 139:1-30. (1970).

MORI, S. AND LEBLOND, C.P. Electron microscopic features and proliferation of astrocytes in the corpus callosum of the rat. J. Comp. Neurol. 137:197-226. (1969).

MORI, S. AND LEBLOND, C.P. Identification of microglia in light and electron microscopy. J. Comp. Neurol. 135:57-80. (1969).

MUGNAINI, E. AND WALBERG, F. Ultrastructure of neuroglia. Ergeb. Anat. Entwicklungsges 37:403-418. (1964).

MURABE, Y. AND SANO, Y. Morphological studies on neuroglia.V. Microglial cells in the cerebral cortex of the rat with special reference to their possible involvement in synaptic function. Cell Tissue Res :223-493. (1982a).

MURPHY, S. AND PEARCE, B. Functional receptors for neurotransmitter on astroglial cells. Neurosci. 22:381-394. (1987).

MYERS, R.H., VONSATTEL, M.D., PASKEVICH, M.A., KIELY, D.K., STEVENS, B.A., CUPPLES, L.A., RICHARSON Jr, M.D. AND BIRD, M.D. Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in huntington's disease caudate nucleus. J.Neuropathol Exp. 50:729-742. (1991).

NAGATSU, I., NAGATSU, T., YAMAMOTO, T., GLENNER, G.G. AND MEHL, J.W. Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme. Biochem. Biophys. Acta 198:255-270. (1970).

NAJLERHIM, A., FRANCIS P.T. AND BOWEN D.M. Aged related-alteration in excitatory amino acid neurotransmission in rat brain. Neurobiol. Aging. 11: 155-8 (1990).

NATHANIAL, J.H. AND NATHANIAL, D.R. The reactive astrocyte. Adv Cell Neurobiol 2:249-301. (1981).

NAVASCUES MARTINEZ, J. Densidad neuronal en el area visual primaria del cerebro de gato. Tesis Doctorales de la Universidad de Granada. Eds. Secretariado de la Universidad de Granada. nº180. (1978).

NICKLAS, W.J., NUÑEZ R., BERL, S. AND DUVDISIN, R. Neuronal glial contributions to neurotransmitter amino acid metabolism: studies with kainic acid induced lesions of rat striatum. J. Neurochem. 33: 839-44. (1979).

NOEZEL, H. AND SIEPMANN, P. Autoradiographische untersuchungen am großhirn neugeborener ratten nach injektion von thymidin-H<sup>3</sup>. Dt.Z.Nery. Heilk. 187:637-659. (1965).

NOTO, T. AND NAKAJIMA T. GABA synthesized from putrescine in rat brain and its enhanced release by high k<sup>+</sup> in caudate. In: Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltammetry and push-pull perfusion. (Ed.) R.D. Myers and P.J. Knott. pp. 499-502. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 473. (1986).

NOWYCKY, M.C., FOX, A.P. AND TSIEN, R.W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. Nature. 316: 440-3. (1985).

O'KUSKY, J. AND COLONNIER, M. A laminar analysis of the number of neurons, glia, and synapses in the visual cortex (Area 17) of adult Macaque Monkeys. The Journal of Comparative Neurology 210:278-290. (1982).

OGDEN, G. AND FOLDI, P. Amino acid analysis: An overview of current methods. Liquid Chromatography-Gas Chromatography 5: 28-40. (1987).

OJA, S.S. AND KONTRO, P. Taurine. In: Handbook of Neurochemistry. (Ed.) A. Lajtha. pp. 501-34. Plenum Press. New York. (1983).

OJA, S.S. AND KONTRO, P. Release of endogenous taurine y GABA from brain slices from the adult and developing mouse. J. Neurochem. 52(4): 1018-24.(1989).

OLIVER, C. Lipofuscin and ceroid accumulation in experimental animals. In R. S. Sohal (ed), Age Pigments.New York:Elsevier/North-Holland, 317-335 (1981).

OLNEY, J.W., HO, O.L. AND RHEE, V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. Exp. Brain Res. 14: 61-76. (1971).

OLNEY J.W. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In McGeer E.G., and col. (eds): Kainic acids as a Tool in Neurobiology. New York, Raven Press. pp: 95-121. (1978).

OLNEY, J.W., PRICE M.T., SAMSON L. AND COL. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. Neurosci. Lett. 65: 65-71. (1986).

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science. 164: 719-21. (1969).



## Bibliografía

---

- ORDY, J.M. The nervous system, behavior and aging: an interdisciplinary life-span approach. En: Neurobiology of aging advances in Behavioral Biology, vol. 16. Eds: J.M. Ordly and K.R. Brizzee. pp. 85-118. Plenum Press, New York. (1975).
- PALMER, A.M., WILCOCK, G.K., ESIRI, P.T. AND COL. Monoaminergic innervation of the frontal and temporal lobe in Alzheimer's disease. Brain Res. 401: 231-8 (1987).
- PALMER, A.M. AND GERSHON S. Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic. The FASEB J. 4: 2745-52. (1990).
- PALMER, A.M. AND BOWEN, D.M. Neurochemical basis of dementia of the Alzheimer type: contribution of postmortem and antemortem studies. In Biological Markers of Dementia of Alzheimer Type: Proceedings of the Stiftelsen Gamla Tjanarinnor Symposium on Aging and Aging Disorders, 1. (Fowler, C. Carlson, L.A. AND COL. eds.) pp. 89-105, Smith-Gordon and Co. Ltd., London (1990).
- PASANTES-MORALES, H. AND MORAN, J. In: Regulatory mechanisms of synaptic transmission. (Ed.) R. Tapia and C.W. Cotman. pp.141-54. Plenum Press. New York. (1981).
- PATEL, A.J., AND HUNT, A. Regulation of production by primary cultures of rat forebrain astrocytes of atrophic factor important for the development of cholinergic neurons. Neurosci. Lett. 99:223-228. (1989).
- PAULSEN, R.E. AND FONNUM, F. Role of glial cells for the basal and Ca<sup>++</sup>- dependent K<sup>+</sup>-evoked release of transmitter amino acid investigated by microdialysis. J. Neurochem. 52(6): 1823-9. (1989).
- PAXINOS, G. AND WATSON. The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York (1982)
- PEINADO J.M. AND MYERS R.D. In vivo analysis of cortical amino acid neurotransmitter collected in the rat by a new double lumen push-pull catheter system. Neuroscience 24: 1027-34. (1988 "a").
- PEINADO J.M. AND MORA F. Glutamic acid as putative neurotransmitter of the interhemispheric cortico-cortical connections in the rat. J. Neurochem. 47: 1598-603. (1986).
- PEINADO, J.M., GOMEZ-CAPILLA, J.A. AND MORA, F. Cerebral cortex and amino acid neurotransmitters: Higher levels of aspartic acid but not GABA in the frontal cortex of the rat. Brain Res. Bull. 12: 625-27. (1984).

PEINADO J.M., McMANUS K.T. AND MYERS R.D. Rapid method for microanalysis of endogenous amino acid neurotransmitter in brain perfusates in rat by isocratic HPLC-EC. Journal of Neuroscience Methods. 18: 269-76. (1986).

PEINADO, J.M., NIETO, L., IRIBAR, M.C. AND COL. Liberacion de aminoacidos neurotoxicos en la corteza frontal de la rata vieja. Efecto de la estimulacion con elevadas concentraciones de potasio. En Bases Neuroquimicas del Envejecimiento Cerebral. (1991).

PENFIELD, W. Oligodendroglia and its relation to classical neuroglia. Brain 47:430-452. (1924).

PENFIELD, W. Neuroglia and microglia. The interstitial tissue of the central nervous system. En Special Cytology. Cowdry E.V.(Ed). Hoeber. New York. pp:1445-1482. (1932).

PERRY, V.H. Macrophages, microglia and cell death in the developing mouse brain. Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia 59:281-295. (1985).

PERRY, T.L., HANSEN, S. AND GANDHAM, S.S. Postmortem changes of amino compounds in human and rat brain. J. Neurochem. 36: 406-12. (1981).

PERRY, V.H. AND GORDON, S. Resident macrophages of the central nervous system : modulation of phenotype in relation to specialised microenvironment. En Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases. Goetyl E. y Spector H. (Eds). pp:119-125. Alan R. Liss. New York. (1989).

PERRY, V.H. AND GORDON, S. Macrophages and microglia in the nervous system. Trends. Neurosci. 11:273-277. (1988).

PERRY, V.H., HUME, D.A. AND GORDON, S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. Neuroscience 15/2:313-326. (1985).

PETERS, A., JOSEPHSON, K. AND VICENT, S.L. Effects of aging on the neuroglial cell and pericytes within area 17 of the rhesus monkey cerebral cortex. Anat. Rec. 229:384-398.(1991).

PETERS, A., PALAY, S.L. AND WEBSTER, H.de F. The fine structure of the nervous system. The cells and their processes. Hoeber (Haper and Row). New York. (1970).

PETERS, A. The formation and structure of myelin sheaths in the central nervous system. J. Biophys Biochem. Cytol. 8:431-446. (1960).

## Bibliografía

---

PETERSON, C. AND GIBSON, G.E. Aging and 3,4-diaminopyridine alter synaptosomal calcium uptake. J. Biol. Chem. 258:11482-11486. (1983).

PETRIDES, M. Motor conditional associative learning after selective prefrontal lesions in the monkey. Behav Brain Res 5:407-413 (1982).

PLAITAKIS, A., BERL, S. AND YAHR, M.D. Abnormal glutamate metabolism in a adult-onset degenerative neurological disorder. Science 216:193-196. (1982).

POLLOCK, N.J., AND WOOD, J.G. Differential sensitivity of the microtubule associated protein tau in Alzheimer's disease tissue to formalin fixation. J. Histochem. Cytochem. 36:1117-1121.(1988).

POTASNER S.J. The spontaneous and electrically evoked release from slices of guinea pig cerebral cortex of endogenous amino acids labelled via metabolism of D(14-C) glucose. J. Neurochem. 31: 177-86. (1978).

PRASAD, C. Thyrotropin releasing hormone. En:Handbook of Neurochemistry. vol 8 Ed. Lajtha. Plenum pp. 175-200. (1985).

PRICE, M.T., OLNEY, J.W. AND HAFT, R. Aged-related changes in glutamate concentration and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. Life Sci. 28: 1365-70. (1981).

PRICE, J.L., DAVIS, P.B., MORRIS, J.C., AND WHITE D.L. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging. 12:295-312. (1991).

PRICE, M.T., OLNEY, J.W., SAMSON, L. AND COL. Calcium influx accompanies but does not cause excitotoxin-induced neuronal necrosis in retina. Brain Res. Bull. 14: 369-76. (1985).

PROBST, A., CORTES, R., ULRICH, J. AND COL. Differential modification of muscarinic cholinergic receptor in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease: an autoradiographic study. Brain Res. 450: 190-201 (1988).

PROCTER, A.W., LOWE, S.L., PALMER, A.M. AND COL. Topographical distribution of neurochemical changes in Alzheimer's disease. J. of Neurological Sciences. 84: 125-40 (1988b).

PROCTER, A.W., PALMER, A.M., FRANCIS, P.T. AND COL. Evidence of glutamatergic denervation and possible abnormal metabolism in Alzheimer's disease. J. Neurochem. 50: 790-802. (1988a).

PULSINELLI, W.A., BRIERLY, J.B., PLUM, F. AND COL. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. Ann. Neurol. 11:491-198. (1982).

QUASTEL, J.H. Cerebral glutamate-glutamine interrelation in vivo and in vitro. Dynamic Properties of Glia Cells. 153-162. (1978).

RALPH, M.R. AND MENAKER, M. GABA regulation of circadian responses to light. In involvement of GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine and GABA<sub>B</sub> receptors. J. Neurosci. 9(8): 2858-65. (1989).

RAPOPORT, S.I., DUARA, R. AND HAXBY, J.V. Positron emission tomography in normal aging and Alzheimer's disease. Psychopharmacol. Bull. 20: 466-71 (1984).

REUBI, J.C. Comparative study of the release of glutamate and GABA newly synthesized from glutamine, in various regions of CNS. Neuroscience 5: 2145-50. (1980).

REYNOLDS, J.N. AND CARLEN, P.L. Diminished calcium currents in aged hippocampal dentate gyrus granule neurons. Brain Res. 479: 384-90 (1989).

RICHARDSON, E.P. Neuronal degeneration of aging. En: Human Motor Neuron Diseases. Ed. L.P. Rowland. pp: 115-9. Raven Press, New York (1982).

RINNE, J.O., LONNBERG, P. AND MARJAMAKI, P. Age-dependent decline in human brain dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors. Brain Res. 508 (2): 349-52 (1990).

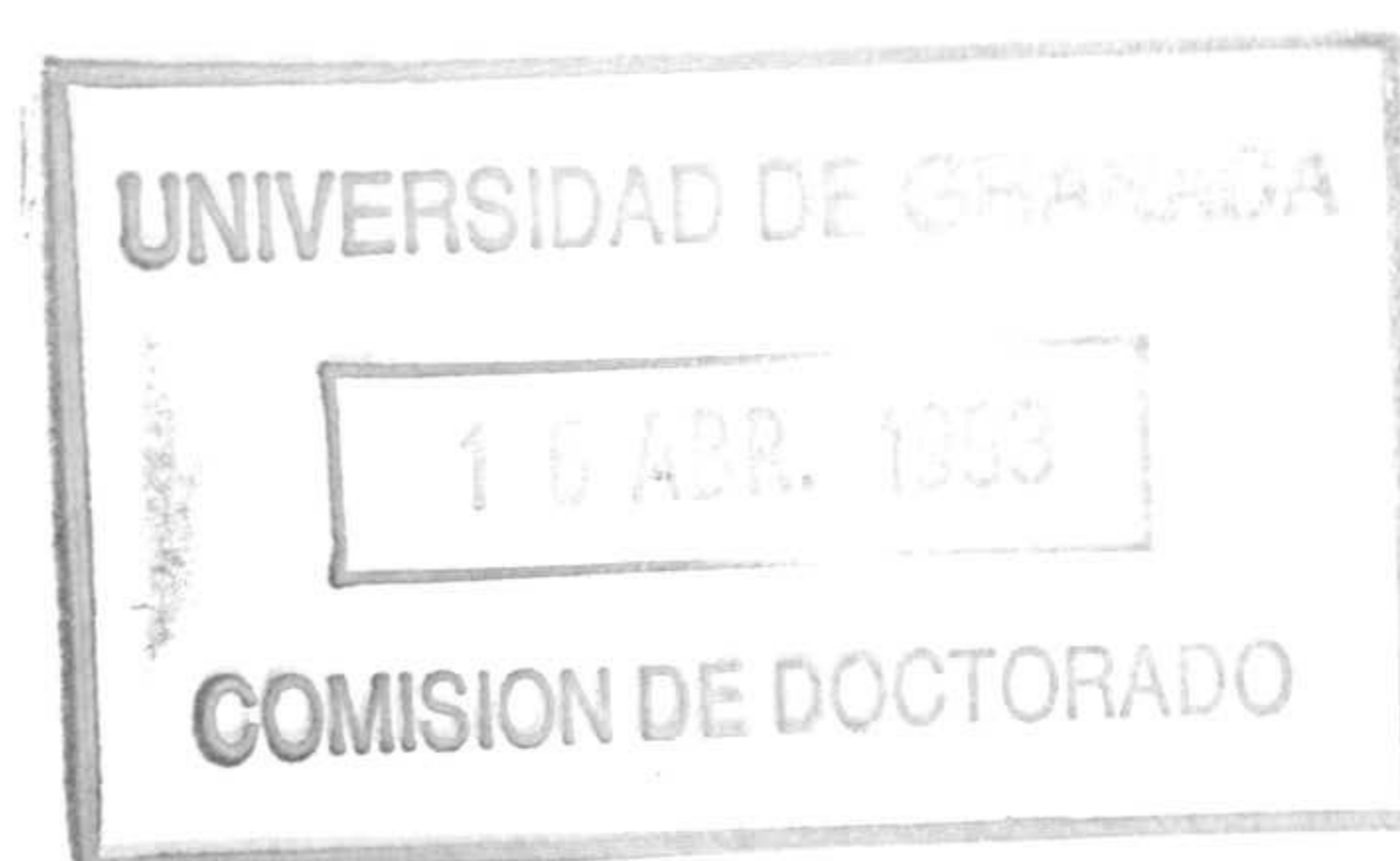
RIO HORTEGA, P. Microglia. In Penfield w, ed. Cytology and cellular pathology of the nervous system. Vol2. New York, Paul P Hocker,483. (1932).

ROBERTSON, W.F. A Textbook of Pathology in Mental Diseases. Clay, Edinburgh. (1900).

ROBERTSON, W.F. On new method obtaining a black reaction in certain tissue-elements of the central nervous system (platinum method). Scott. med. surg.j. 4:23-30. (1899).

ROGERS, J., AND BLOOM, F.E. Neurotransmitters metabolism and function in the ageing Central Nervous System. En Handbook of the Biology of Ageing. Schneider E. and Finch C.E. (eds). Van Nostrand Reinhold. New York. pp:645-691.(1985)

ROGERS, J. AND STYREN, S.D. Neuroanatomy of aging and dementia. Rev Biol. Res. Aging 3:223-253. (1987).



## Bibliografía

---

ROSE, J.E., AND WOOLSEY, C.N. The orbito-frontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. Res. Publ. Ass. Res. Nerv. Ment. Dis. 27:210-232. (1948).

ROSE, M. Citoarchitektonischer Atlas der Großhirnrinde der Maus. J. Psychol. Neurol. 40:1-51 (1929).

ROTHMAN S.M. The neurotoxicity of excitatory amino acid is produced by passive chloride influx. J.Neurosci. 5: 1483-89. (1985).

ROTHMAN, S.M., THURSTON, J.H. AND HAUHART R.E. Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro. Neuroscience. 22: 471-80. (1987).

SAITO, K., BARBER, R., WU, J.Y.,MATSUDA, T., ROBERTS, E. AND VAUGHN, J.E. Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 71: 269-73. (1974).

SATRUSTEGUI, J., MARTINEZ-SERRANO, A. AND BOGONEZ, E. Variaciones en la homeostasis del calcio en sinaptosomas durante el envejecimiento. En: Bases Neuroquímicas del Envejecimiento cerebral. (1991).

SCHEIBEL, M.E., LINDSAY, R.D., TOMIYASU, U., AND SCHEIBEL, A.B. Progressive dendritic changes in aging human cortex. Exp.Neurol.47:392-403. (1975).

SCHENEIDER, H.J., HOEPKER, H.R. AND FÖLDI, P. HPLC aminosäuren analyse precolumn derivatisierung. LKBG GmbH Gräfelfing, Federal Republic of Germany. (1986).

SCHIPPER, H. AND MATEESCU-CANTUNIARI, A. Identification of peroxidase-positive astrocytes by combined histochemical and immunolabeling techniques in situ and cell culture. The Journal of Histochemistry and Citochemistry. 39:1009-1016 (1991).

SCHMID, R., SIEGHART, W. AND KAROBATH, M. Taurine uptake in synaptosomal fractions of rat cerebral cortex. J.Neurochem. 25: 5-9. (1975).

SCHNEBLI, H.P., PHILLIS, M.A. AND BARCLAY, R.K. Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. Biochim. Biophys. Acta 569:89-98. (1979).

SCHOUSBOE, A., HERTZ, L. AND SVENNEBY, G. Uptake and metabolism of GABA in astrocyte cultures from dissociated mouse brain hemispheres. Neurochem.Res.2:217-229. (1977).

- SCHOUSBOE, A. AND HERTZ, L. Role of astroglial cells in glutamate homeostasis. In: *Glutamate as a Neurotransmitter*, Raven Press, N.York 103-113 (1981).
- SCHULTZ, R.L. Macroglial identification in electron micrographs. J. Comp. Neurol.122:281-295. (1964).
- SCHWARCZ R., WHETSELL W.O. AND MANGANO R.M. Quinolinic acid: An endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. Science. 219: 316-8. (1983).
- SELKOE, D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron 6:487-498. (1991).
- SHANK, R.P. AND CAMPBELL, G.L.M. Glutamate. In: Handbook of Neurochemistry. (Ed.) A. Lajtha. pp.381-404. Plenum Press. New York. (1983).
- SHANK, R.P. AND APRISON, M.H. Present status and significance of the glutamine cycle in neural tissues. Life Sci. 28: 837-42. (1981).
- SHEPHERD G.M. The synaptic organization of the brain.: An introduction. pp.238- 243. Oxford University. Press New York. (1974).
- SHIKIMI, T. AND IWATA, H. Pharmacological significances of peptidase and proteinase in the brain. II. Purification and properties of a brady kinin inactivating enzyme from rat brain. Biochem. Pharmacol 19:1399-1407. (1970).
- SHIMADA, M., AKAGI, N., GOTO, H. WATANABE, H. NAKANISHI, M., HIROSE, Y. AND WATANABE, M. Microvessel and astroglial cell densities in the mouse hippocampus. J.Anat180:89-95. (1992).
- SHIMADA, A., KUWAMURA, M., UMEMURA, T., TAKADA, K., OHAMA, E. AND ITAKURA, C. Modified bielschowsky and immunohistochemical studies on senile plaques in aged dogs. Neuroscience Letters,129:25-28. (1991).
- SIESJO B.K. Historical overview: Calcium, ischemia and death of brain cells. Ann. NY Acad. Sci. 522: 638-61. (1988).
- SIMMACO, M., BARRA, D. AND BOSSA, F. Separation of Phenylthiohydantoin amino acids by high performance liquid chromatography and some applications in dansyl Edman sequence analysis. J. Chromatog. 349: 99-103 (1985).
- SIMPKINS, J.W. AND MILLARD, W.J. Influence of age on neurotransmitter function. Endocrinology and Aging. 16 (4): 893-917 (1987).

## Bibliografía

---

- SIMS, N.R., BOWEN, D.M., ALLEN, S.J. AND COL. Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. J.Neurochem. 40: 503-9 (1983).
- SKILLING S.R., SMULLIN D.H., BEITZ A.J. and LARSON A.A. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. J. Neurochem. 51(1): 127-32. (1988).
- SMART, I. AND LEBLOND, C.P. Evidence for division and transformations of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from radioautography after injection of thymine-H3 ?? J. Comp. Neurol. 116:349-367. (1961).
- SMITH, C.G. The volume of the neocortex of the albino rat and the changes it undergoes with age after birth. J. comp. Neurol. 60:319-347. (1934).
- SMITH, E.L., KAUFMAN, J.T. AND RUTENBURG, A.M. The partial purification of an amino acid Naphthylaminopeptidase from human liver. J. Biol. Chem. 240:1718-1721. (1965).
- SOLIS, J.M., HERRANZ, A.S., HERRERAS, O. AND COL. Does taurine act as an osmoregulatory substance in the rat brain. Neurosci. Lett. 91: 53-8 (1988).
- STALLCUP, W. B., BULLOCH, K. AND BAETGE, E.E. Coupled transport of glutamate and sodium in cerebellar nerve cell line. J.Neurochem. 32: 57-65. (1979).
- STENSAAS, L.J. Pericytes and perivascular microglial cells in the basal forebrain of the neonatal rabbit. Cell Tiss. Res. 158:517-541. (1975).
- STERNBERGER, N.H., ITOYAMA, Y., KIES, M.W. AND WEBSTER, H. DE F. Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. Proc.Natl.Acad.Sci.72:1927-1931. (1978).
- STERNBERGER, N.H. ITOYAMA, Y., KIES, M.W. AND WEBSTER, H. DE F. Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin-forming of newborn rat central nervous system. J. Neurocytol.7:251-263. (1978).
- STONE, T.W. ANDd CONNICK, J.H. Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system. Neuroscience . 15: 597-617. (1985).
- STORM-MATHISEN, J. AND IVERSEN, L.L. Uptake of 3-H-Glutamic acid in excitatory nerve endings. Light and electron microscopic observations in the hippocampal formation of the rat. Neurosci. 4: 1237-53. (1979).

STREHLER, B.L. Fundamental mechanisms of neuronal ageing. En Brain Aging. Neuropathology and Neuropharmacology. J. Cervós-Navarro and H.I. Sarkandel (eds). Raven Press. New York. pp:75-95. (1983).

STREIT, W.J., GRAEBER, M.B. AND KREUTZBERG, G.W. Funtional plasticity of microglia: A rewiew. Glia 1:301-307. (1988).

STRONG, R., SAMORAJSKI, T. AND GOTTFELD, Z. High-affinity uptake of neurotransmitters in rat neostriatum effects of aging. J. Neurochem. 43: 1766-8. (1984).

STUBEL, H. Die Floureszenz tienscher Gewebe in ultraviolotten Licht. Pfluegers Arch. Gesamte Physiol.142:1-14. (1911).

STURROCK, R.R. Stability of neuron number in the subthalamic and entopeduncular nuclei of the aging mouse brain. J. Anat. 179:67-73. (1991).

STURROCK, R.R. Light microscopic identification of immature glial cells in semithin sections of the developing mouse corpus callosun. J.Anat.122:521-537. (1976).

STURROCK, R.R. A comparative quantitative and morphological study of aging in the mouse neostriatum, indusium griseum and anterior comisure. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 6:415-420.(1980).

STURROCK, R.R. Problems of glial identification and quantifications in the Aging Centlal Nervous System. Brain Aging. Neuropathology and Neuropharmacology. J. Cervós-Navarro and H.I. Sarkander (eds). Raven Press. New York. pp: 179-209.(1983).

STURROCK, R.R. Histogenesis of the anterior limb of the anterior commissure of the mouse brain.III. An electronmicroscopic study of gliogenesis. J.Anat.117:37-53. (1974).

SUBBALASKSHMI, G. AND MURPHY, C.R.K. Isolation of astrocytes, neurons and synaptosomes of rat brain cortex: Distribution of enzymes of glutamate metabolism. Neurochem. Res. 10: 239-50. (1985).

SUGIYAMA, H., ITO I. AND HIRONO, C. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. Nature. 325: 531-3. (1987).

SUMMERS, W.K., MAJORSKI, L.V., MARSH, G.H. AND COL. Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. N. Engl. J. Med. 315: 1241-5 (1986).



## Bibliografía

---

SUSZKIW, J.B. AND BRECHAR, A.S. Brain aminoacylarylamidase. Further purification of the soluble bovine enzyme and studies on substrate specificity and possible active-site residues. Biochemistry 9:4008-4017. (1970).

TANAKA, H., ARAKI, M. AND MASUZAWA, T. Differential response to three astrocyte-specific proteins to fimbrial transections of the rat brain: Immunohistochemical observations with antibodies against glial fibrillary acidic protein, glutamine synthetase and S-100 protein. Acta Histochem. Cytochem. 24:11-19. (1991).

TAPIA, R.  $\Gamma$ -Aminobutyric acid: metabolism and biochemistry of synaptic transmission. (Ed.) A. Lajtha. pp. 423-66. Plenum Press. New York. (1983).

TARDY, M. Astrocyte et homéostasie. Medicine /sciences. 8/7:799-804. (1991).

TECOMA, E.S. AND CHOI, D.W. GABAergic neocortical neurons are resistant to NMDA receptor-mediated injury. Neurology. 39: 676-82. (1989).

TERRY, R.D., DE TERESA, R., LAWRENCE, A., AND HANSEN, M.D. Neocortical cells counts in normal human adult ageing. Ann. Neurol. 21:530-539.(1987).

TEWS, J.K., RIEGEL, E.A. AND HARPER, A.E. Effects of dietary GABA and proteins on growth, food intake and GABA metabolism in the rat. Brain Res. Bull. 5: 245-51. (1980).

TIGGES, J., GORDON, T.P., McCLURE, H.M., HALL, E.C. AND PETERS, A. Survival rate and life span of rhesus monkeys at the Yerkes Regional Primate Research Center. Amer. J. Primatol., Bethesda, Maryland. (1988).

TIGGES, J., HERNDON, J.G. AND PETERS, A. Neuronal population of area 4 during the life span of the rhesus monkey. Neurobiol. Aging. 11:201-208 (1990).

TOSSMAN, U., DELIN, A., ERIKSSON, L.S. AND UNGERSTEDT, U. Brain cortical amino acids measured by intracerebral dialysis in porto-caval shunted rats. Neurochem. Res. 12: 265-9. (1987).

TRAFICANTE, L.J., ROTROSEN, J. SIEKIERSKI, J., TRACER, H. AND GERSHON, S. Enkephalin inactivation by N-terminal tyrosine cleavage: Purification and partial characterization of a highly specific enzyme from human brain. Life. Sci. 26:1697-1706. (1980).

TRILLO, L. AND GONZALO, L.M. Ageing of the human entorhinal cortex and subicular complex. Histol Histopath. 7:17-22. (1992).

## Bibliografía

---

- WAALAS, I. AND FONNUM, F. Biochemical evidence for  $\Gamma$ -aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. Neurosci. 5: 63-72. (1980).
- WALKER, J.E. Glutamate, GABA, and CNS disease: A review. Neurochem. Res. 8: 521-50. (1983).
- WARD, H.W., THANKI, C.M. AND BRADFORD, H.F. Glutamine and glucose as precursor of transmitter amino acids: Ex vivo studies. J. Neurochem. 40: 855-60. (1983).
- WEIBEL, E.R. Stereological Methods Vol2. Theoretical Foundations. Academic Press. London. New York. Sidney. San Francisco. (1980).
- WEIBEL, E.R. Stereological Methods. Vol I. Practical methods for biological morphometry. Academic Press. London. New York. Sydney. San Francisco. (1979).
- WELKER, C. Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. J. Comp. Neurol. 166:173-190. (1976).
- WENDEL-SMITH, C.P., BLUNT, M.J. AND BALDWIN, F. The ultrastructural characterization of macroglial cell types. J.Comp.Neurol.127:219-240. (1966).
- WENK, G.L., PIERCE, D.J., STRUBLE, R.G. AND COL. Age-related changes in multiple neurotransmitter system in the monkey brain. Neurobiology of Aging. 10: 11-9 (1989).
- WENTHOLD, R.J. Glutamate and aspartate as neurotransmitters for the auditory nerve. Adv. Biochem. Psychopharmac. 27: 69-78.(1981).
- WHEELER, D.D. Aging of membrane transport mechanism in CNS- high affinity cholinetransport in rat cortical synaptosomes. Exp. Gerontol. 20: 73-80 (1985).
- WHITE, E.L. Cortical circuits: Synaptic Organization of the cerebral cortex. Birkhauser, Boston. (1989).
- WHITHOUSE, P.J., MARTINO, A.M., WAGSTER, M.N. AND COL. Reductions in <sup>3</sup>- H-nicotinic acetylcholine binding in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: an autoradiographic study. Neurology 38: 721-3 (1988).
- WIESENDANGER, R., AND WISENDARGER, M. The corticopontine system in the rat. I. Mapping of corticopontine neurons. J. Comp. Neurol. 208:215-226. (1982).

WISNIEWKY, H.M., AND TERRY, R.D. Neuropathology of the aging brain. Aging (N.Y.) 3: 265-80 (1976).

WOLFENSBERGER, M., AMSLER, V., CANZECK, V. AND CUENOD, H. Gas chromatographic method for the determination of trace amounts of putative amino acid from brain perfusates collected in vivo. J. Neurosci. Meth. 5: 253-60. (1982).

WOOD, P.L., KIM, H.S. AND MARIEN, M.R. Intracerebral dialysis: direct evidence for the utility of 3-MT measurements as an index of dopamine release. Life Sci. 41: 1-5 (1987).

WOOSLEY, C.M., AND LEMESSURIER, D.H. The pattern of cutaneous representation in the rat's cerebral cortex. Fed. Proc. 7:137-138. (1948).

YOUNG, A.B., BROMBERG, M.B. AND PENNEY, J.B. Decreased glutamate uptake in subcortical areas deafferent by sensorimotor cortex ablation in the cat. J. Neurosci. 1: 241-9. (1981).

ZILLES, K., ZILLES, B., AND SCHLEICHER, A. A quantitative approach to cytoarchitectonic VI. The areal pattern of the cortex of the albino rat. Anat. Embriol. 159: 365-360. (1980).

ZILLES, K., AND WREE, A. Cortex: Areal and laminar structure. En The rat nervous system Paxinos G. (Ed). Academic Press. Australia. pp:375-415.(1985).