

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**GLUCOCORTICOIDES E INTERACCIÓN DE
NEUROTRANSMISORES EN EL NÚCLEO ACCUMBENS :
EFECTO DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL Y DEL
ENVEJECIMIENTO**

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

Marta de Blas de la Peña

Bajo la dirección del doctor

Gregorio Segovia Camargo

Madrid, 2012

Marta de Blas de la Peña, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Glucocorticoides e interacción de neurotransmisores en
el núcleo accumbens: efecto del enriquecimiento
ambiental y del envejecimiento.

Tesis Doctoral

Marta de Blas de la Peña

2011

ÍNDICE:

ABREVIATURAS.	v
INTRODUCCIÓN.	
<u>1. Enriquecimiento ambiental.</u>	1
<u>2. Envejecimiento.</u>	4
Envejecimiento y enriquecimiento ambiental.	6
<u>3. Estrés, glucocorticoides y neurotransmisores.</u>	8
Estrés y enriquecimiento ambiental.	12
Estrés y envejecimiento.	13
<u>4. Núcleo accumbens.</u>	15
Núcleo accumbens y enriquecimiento ambiental.	18
Núcleo accumbens y envejecimiento.	19
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.	20
MATERIALES Y MÉTODOS.	
<u>1. Animales.</u>	26
<u>2. Experimentos de perfusión intracerebral <i>in vivo</i> (microdiálisis).</u>	
2.1. Construcción de implantes.	26
2.2. Construcción de cánulas de microdiálisis.	27
2.3. Cirugía estereotáxica.	30
2.4. Sistema de perfusión <i>in vivo</i> (microdiálisis).	31
2.5. Protocolo de perfusión.	33
2.6. Preparación de drogas.	33
2.7. Medida de la actividad motora.	34
2.8. Análisis de neurotransmisores por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	
<u>2.8.1. Detección de catecolaminas.</u>	34
2.8.1.1. Condiciones cromatográficas.	35
2.8.1.2. Calibración.	36
2.8.1.3. Cálculo del coeficiente de variación.	37
2.8.1.4. Linealidad del análisis cromatográfico.	37
<u>2.8.2. Detección de aminoácidos.</u>	38

2.8.2.1. Condiciones cromatográficas.	39
2.8.2.2. Calibración.	41
2.8.2.3. Cálculo del coeficiente de variación.	41
2.8.2.4. Linealidad del análisis cromatográfico.	42
2.9. Verificación de la localización de la cánula de microdiálisis.	42
<u>3. Cuantificación de la expresión de ARNms específicos.</u>	
3.1. Extracción del tejido.	43
3.2. Extracción del ARN.	43
3.3. Cuantificación del ARN.	44
3.4. Síntesis de ADNc.	47
3.5. Amplificación del ADNc.	48
<u>4. Evaluación de la actividad motora espontánea.</u>	52
<u>5. Análisis estadístico.</u>	53

RESULTADOS.

1.Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la coperfusión de agonistas glutamatérgicos y de corticosterona en el núcleo accumbens de la rata despierta en animales de 6 meses de edad.

1.1. Efecto de la perfusión de NMDA (500µM).

1.1.1. Efecto sobre la concentración extracelular de dopamina. 55

1.1.2. Efecto sobre la concentración extracelular de GABA 56

1.1.3. Efecto sobre la actividad motora. 57

1.2. Efecto de la perfusión de AMPA (100µM).

1.2.1. Efecto sobre la concentración extracelular de dopamina. 65

1.2.2. Efecto sobre la concentración extracelular de GABA. 66

1.2.3. Efecto sobre la actividad motora. 67

2. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la coperfusión del agonista glutamatérgico NMDA (500µM) y de corticosterona (600ng/ml) en el núcleo accumbens de la rata despierta en animales de 15 meses de edad.

2.1. Efecto sobre la concentración extracelular de dopamina. 75

2.2. Efecto sobre la concentración extracelular de GABA.	76
2.3. Efecto sobre la actividad motora.	76
<u>3. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la coperfusión del agonista glutamatérgico NMDA (500µM) y de corticosterona (600ng/ml) en el núcleo accumbens de la rata despierta en animales de 27 meses de edad.</u>	
3.1. Efecto sobre la concentración extracelular de dopamina.	84
3.2. Efecto sobre la concentración extracelular de GABA.	84
3.3. Efecto sobre la actividad motora.	85
<u>4. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de receptores en el núcleo accumbens y estriado de la rata.</u>	
4.1. Núcleo accumbens.	
<u>4.1.1. Expresión de receptores NMDA.</u>	93
<u>4.1.2. Expresión de receptores AMPA.</u>	93
<u>4.1.3. Expresión de receptores de glucocorticoides.</u>	94
4.2. Estriado.	
<u>4.2.1. Expresión de receptores NMDA.</u>	99
<u>4.2.2. Expresión de receptores AMPA.</u>	99
<u>4.2.3. Expresión de receptores de glucocorticoides.</u>	100
<u>5. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la actividad motora espontánea de los animales de 6 y 27 meses de edad.</u>	
5.1. Efecto sobre la actividad horizontal.	105
5.2. Efecto sobre la actividad vertical.	105

DISCUSIÓN.

<u>1. Acerca de los métodos.</u>	
1.1. Sobre la microdiálisis.	109
1.2. Sobre el significado de las concentraciones de neurotransmisores recogidos mediante microdiálisis.	111
1.3. Sobre el análisis cromatográfico.	112
1.4. Sobre el modelo de enriquecimiento ambiental.	113
1.5. Sobre la PCR a tiempo real.	113
<u>2. Acerca de los resultados.</u>	
2.1. Sobre los efectos del enriquecimiento ambiental en animales jóvenes.	

<u>Sobre las acciones de los agonistas NMDA y AMPA.</u>	116
<u>Sobre las acciones de la corticosterona.</u>	120
2.2. Sobre el efecto del envejecimiento sobre las acciones de la corticosterona.	123
CONCLUSIONES.	126
BIBLIOGRAFÍA.	127

ABREVIATURAS:

ACh: acetilcolina

ACTH: corticotropina

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, *brain derived neurotrophic factor*)

CA1: área 1 del *cornus ammonis* (hipocampo)

CORT: corticosterona

Ct: valor umbral de ciclos (del inglés, *cycle threshold*)

DA: dopamina

DEPC: dietil-piromcarbonato

DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético

GABA: ácido gamma-aminobutírico (del inglés, *gamma-aminobutyric acid*)

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía (del inglés, *glial derived neurotrophic factor*)

Glu: glutamato

GR: receptores de glucocorticoides (tipo II)

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, *high pressure liquid chromatography*)

HVA: ácido homovanílico (del inglés, *homovanillic acid*)

LCRs: líquido cefalorraquídeo sintético

LTD: depresión a largo plazo (del inglés, *long-term depression*)

LTP: potenciación a largo plazo (del inglés, *long-term potentiation*)

MR: receptores de mineralocorticoides (tipo I)

NGF: factor de crecimiento neural (del inglés, *nerve growth factor*)

NMDA: N-metil-D-aspartato

n.s.: no significativo

OPA: O-ftaldehído

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)

RT-PCR: PCR a tiempo real (del inglés, *real-time PCR*)

TTX: tetrodotoxina

INTRODUCCIÓN

1. Enriquecimiento ambiental.

Ya en el siglo XIX grandes figuras de la ciencia como Lamarck, Darwin y Cajal observaron que las experiencias que vive un individuo, y el aprendizaje derivado de ellas, producen cambios en el cerebro (Solinas et al., 2009). Cada día se hace más patente la importancia que el entorno tiene sobre la vida de un individuo. Así, se ha descrito que las condiciones ambientales juegan un papel importante en la adicción a drogas (Bardo et al., 2001;Green et al., 2003;Solinas et al., 2008;Chauvet et al., 2009;Green et al., 2010), en el proceso de envejecimiento cerebral y en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (van Praag et al., 2000;Nithianantharajah and Hannan, 2009). Es por ello que cada vez son más los estudios que utilizan modelos animales para poder describir los cambios que las diferentes condiciones de vida pueden ejercer sobre diversos parámetros fisiológicos, comportamentales y cognitivos. Uno de los modelos más utilizados es el de enriquecimiento ambiental (Mora et al., 2007).

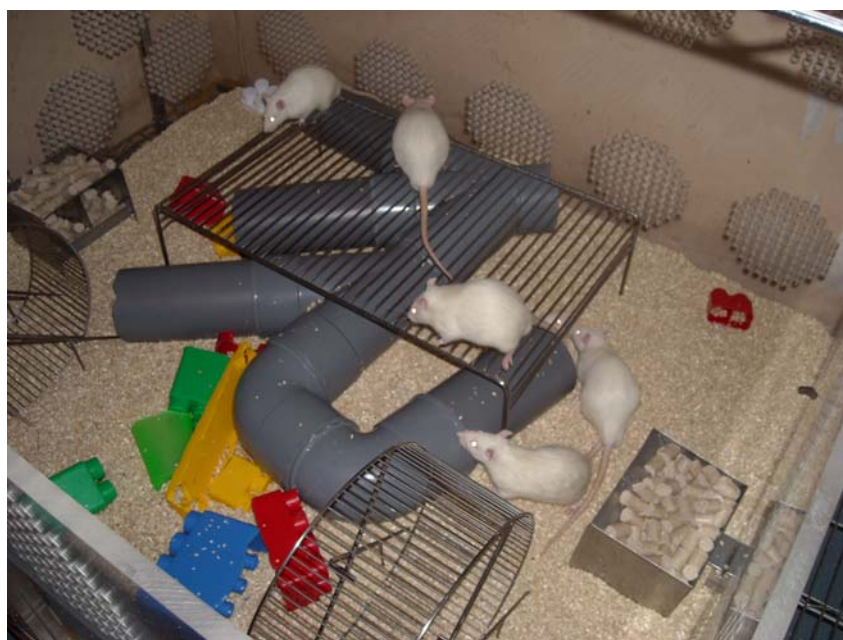


Figura I1. Ratras Wistar mantenidas en condiciones de enriquecimiento ambiental.

El enriquecimiento ambiental es una modificación de las condiciones de mantenimiento de los animales que consiste en un incremento en la estimulación sensorial, social y motora de los mismos (fig. I1). En el cerebro, el enriquecimiento ambiental produce una serie de cambios plásticos tanto morfológicos como neuroquímicos y conductuales (van Praag et al., 2000;Mora et al., 2007). El enriquecimiento ambiental produce cambios morfológicos tales como un aumento en

el peso cerebral, un mayor número de células de glía, mayor tamaño de los somas y los núcleos de las neuronas de corteza y una mayor densidad de espinas dendríticas en las neuronas hipocampales (Mohammed et al., 2002). Mantener a los animales en enriquecimiento ambiental promueve la supervivencia celular, así como la gliogénesis, angiogénesis y sinaptogénesis (Kempermann et al., 1997;van Praag et al., 2000;Segovia et al., 2006;Llorens-Martin et al., 2010a). En las condiciones de enriquecimiento ambiental, además, se promueve la realización de ejercicio físico voluntario, que produce un aumento de la proliferación celular y un reclutamiento de nuevas neuronas en el giro dentado de hipocampo (van Praag et al., 2000;Llorens-Martin et al., 2010b). Estos cambios morfológicos podrían ser debidos a cambios a nivel de factores neurotróficos, ya que se ha descrito que el enriquecimiento ambiental produce un aumento de NGF y BDNF en diversas áreas cerebrales, como hipocampo, cortezas visual y entorrinal y telencéfalo basal (Pham et al., 1999;Ickes et al., 2000;Mohammed et al., 2002;Turner and Lewis, 2003;Rossi et al., 2006;Zhu et al., 2006).

Diferentes estudios neuroquímicos han mostrado cambios en diferentes sistemas neurotransmisores en los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental (Mora et al., 2007). Así, en dopamina se ha descrito una menor expresión de su transportador en corteza prefrontal y estriado (Bezard et al., 2003;Zhu et al., 2004;Zhu et al., 2005). También se ha observado que el enriquecimiento ambiental produce un aumento en los niveles de dopamina en la corteza cerebral y el núcleo accumbens con respecto a los animales aislados (Bowling et al., 1993;Garrido et al., 2010) y un menor número de receptores dopaminérgicos en corteza y estriado (Guisado et al., 1980;del Arco et al., 2007a). En cuanto a los receptores glutamatérgicos, se ha observado que mantener a los animales en condiciones de enriquecimiento ambiental produce un aumento en la expresión de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA en hipocampo de rata (Mlynarik et al., 2004), y un aumento en la expresión de GluR2 y GluR4 de los receptores AMPA en hipocampo de ratón (Naka et al., 2005). Se ha sugerido que el enriquecimiento ambiental modifica también la transmisión mediada por receptores glutamatérgicos NMDA, ya que se ha observado que produce un aumento en los niveles de proteínas NR2A y NR2B (subunidades de dichos receptores) en telencéfalo (Tang et al., 2001).

En cuanto a la acetilcolina, se ha descrito que los animales sometidos a enriquecimiento ambiental muestran una mayor actividad de la enzima acetilcolinesterasa en la corteza cerebral (Rosenzweig and Bennett, 1996). Otro

parámetro que se ve modificado por el enriquecimiento ambiental es la interacción de neurotransmisores. Así, se ha descrito que la activación de los receptores dopaminérgicos D1 produce un aumento de acetilcolina menor en los animales enriquecidos (del Arco et al., 2007a). Por último, los procesos de plasticidad sináptica también son modificados por el enriquecimiento ambiental, ya que los animales mantenidos en esas condiciones muestran un aumento de LTP y LTD, en diversas áreas cerebrales tales como giro dentado y CA1 en el hipocampo, o la corteza cingulada anterior (van Praag et al., 1999;Duffy et al., 2001;Artola et al., 2006;Zhao et al., 2009). Se ha sugerido que este aumento de LTP y LTD podría deberse en parte a la mayor liberación de neurotransmisores que muestran los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, lo que facilitaría la inducción de dichos procesos (Artola et al., 2006).

En consonancia con los cambios celulares y neuroquímicos producidos por el enriquecimiento ambiental, se han descrito también cambios conductuales en animales mantenidos en estas condiciones experimentales. Por ejemplo, los animales mantenidos en ambientes enriquecidos muestran una menor actividad basal al ser expuestos a un ambiente novedoso en comparación con animales aislados (Bowling et al., 1993). También estos animales muestran una mejor estrategia de exploración, interaccionan más con objetos y necesitan menos tiempo para adaptarse a ambientes nuevos o para recuperarse de una situación estresante (Mohammed et al., 2002). Así mismo, se han observado cambios cognitivos en los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental, como son un aumento en la memoria y aprendizaje espacial asociados a hipocampo (Kempermann et al., 1997;Gagné et al., 1998;van Praag et al., 2000;Tang et al., 2001;Mohammed et al., 2002;Lee et al., 2003) y una mejor memoria emocional y de reconocimiento (Tang et al., 2001). En general, se sugiere que el enriquecimiento ambiental hace que los animales sean menos reactivos al estrés, lo que ha sugerido la posibilidad de que éste tenga un efecto ansiolítico frente a diversos estímulos estresantes, pudiendo incluso revertir los efectos negativos de situaciones estresantes que ya haya vivido el individuo (Fox et al., 2006). Además, la menor actividad motora en respuesta a un ambiente novedoso que presentan los animales mantenidos en estas condiciones se ha interpretado como una mejora a la hora de sobrellevar el estrés (Segovia et al., 2009).

El enriquecimiento ambiental tiene efectos beneficiosos en la recuperación tras lesiones cerebrales, como procesos isquémicos o de infarto en la corteza prefrontal (Kolb and Whishaw, 1998;Turner et al., 2002). Así mismo, diferentes modelos

animales han mostrado la efectividad del enriquecimiento ambiental a la hora de reducir algunas de las alteraciones que se producen en patologías como la enfermedad de Parkinson o el Alzheimer (Chen et al., 2005;Nithianantharajah and Hannan, 2006;Nithianantharajah and Hannan, 2009) y en procesos tan complejos como la adicción a drogas (Bardo et al., 2001;Green et al., 2003;Solinas et al., 2009). También se ha observado que los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental presentan una mejor función del sistema inmune (Arranz et al., 2010).

2. Envejecimiento:

La cambiante demografía de nuestra sociedad, y la creciente esperanza de vida, han hecho que cobren relevancia los estudios sobre el envejecimiento, sobre todo acerca del envejecimiento del cerebro y sus funciones. El envejecimiento puede definirse como la pérdida de funciones cognitivas, motoras y sensoriales que tienen lugar como consecuencia de los procesos degenerativos que ocurren con la edad (Mora et al., 2005).

Los cambios que se producen en el cerebro a consecuencia del envejecimiento son específicos de áreas concretas (Mora et al., 2007). Se ha mostrado que el envejecimiento produce una reducción en el volumen de materia gris (Greenough et al., 1986;Finch, 1993), que parece ser consecuencia de una reducción en el número de espinas dendríticas, ya que se ha observado una menor densidad sináptica (Saito et al., 1994;Terry and Katzman, 2001). También se ha observado que el cerebro envejecido mantiene la capacidad de generar nuevas neuronas, aunque en menor medida que el cerebro joven (Kuhn et al., 1996;Segovia et al., 2006). Los cambios en arborización dendrítica muestran que el cerebro envejecido mantiene cierta plasticidad, aunque sea menor que la que muestra el cerebro joven (Rosenzweig and Barnes, 2003), lo que podría ser debido a una reducción en la expresión del factor neurotrófico BDNF en ciertas áreas cerebrales como el hipocampo (Smith and Cizza, 1996;Hayashi et al., 2001). Otros factores neurotróficos como el NGF y el GDNF podrían jugar un papel en los déficits motores y cognitivos que se observan en los animales viejos (Mora et al., 2007). La funcionalidad de las neuronas en áreas como hipocampo y corteza también se ve alterada por el envejecimiento, en concreto, se ha descrito un déficit en LTP y LTD, posibles sustratos para las disfunciones motoras y cognitivas observadas en animales viejos, y una alteración en la homeostasis de calcio, proceso fundamental para la supervivencia neuronal (Mora et al., 2007). Se ha de destacar el hecho de que durante el proceso de envejecimiento no hay muerte

generalizada de neuronas en áreas concretas como la corteza cerebral e hipocampo (Rapp and Gallagher, 1996; Morrison and Hof, 1997).

El envejecimiento también modifica diversos sistemas neurotransmisores y sus complejas interacciones en áreas específicas. Así, en el sistema dopaminérgico, se ha descrito que el contenido de dopamina de estriado se reduce con la edad (Joseph et al., 1990; Makman, 1993; Míguez et al., 1999). De igual modo, la concentración extracelular basal de dopamina es menor en el estriado y núcleo accumbens de los animales viejos (Gerhardt and Maloney, 1999; Segovia et al., 1999), y la liberación de dopamina en accumbens inducida por potasio se ve también reducida por la edad (Friedemann and Gerhardt, 1992; Gerhardt and Maloney, 1999). También se ha descrito una disminución de receptores dopaminérgicos D1 y D2 en estriado de animales viejos (Joseph et al., 1990; Makman, 1993). Además, se ha observado que la liberación de dopamina en corteza prefrontal en respuesta a estrés disminuye con la edad (del Arco et al., 2001).

El sistema glutamatérgico también es sensible al envejecimiento, habiéndose descrito una menor concentración de glutamato en áreas como corteza e hipocampo del cerebro viejo (Segovia et al., 2001). Sin embargo, al estudiar la concentración extracelular basal de glutamato, no se observaron diferencias en corteza cerebral, estriado y núcleo accumbens (Segovia et al., 1999; Segovia et al., 2001). Por el contrario se observó que en hipocampo los niveles basales de glutamato aumentan con la edad (Segovia et al., 2006). Otro factor importante a considerar en cuanto a la neurotransmisión glutamatérgica es el transporte de glutamato mediante transportadores de alta afinidad localizados en astrocitos, ya que es la principal forma de eliminar el glutamato del medio extracelular. En general, se ha observado que los animales viejos muestran una menor recaptura de glutamato en áreas como corteza y estriado (Segovia et al., 2001). También se ha descrito una reducción en la densidad de receptores NMDA en la mayoría de áreas de corteza, estriado e hipocampo, y una reducción en la densidad de receptores AMPA en corteza cerebral y en algunas áreas de hipocampo (Segovia et al., 2001).

En cuanto a la acetilcolina, se ha descrito una disminución muy pronunciada de la neurotransmisión colinérgica en pacientes con enfermedad de Alzheimer, aún cuando el sistema colinérgico no se ve alterado durante el envejecimiento no patológico (Decker, 1987). Estudios de nuestro laboratorio han descrito que la concentración basal de este neurotransmisor en corteza prefrontal disminuye con la

edad (Segovia and Mora, 2005b;Segovia et al., 2008b). En los animales viejos sí que se observa, sin embargo, una disminución en la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos en diversas áreas como telencéfalo basal, estriado y regiones corticales, y una peor autorregulación de la liberación de acetilcolina mediada por ellos (Decker, 1987;Biegon et al., 1988;Moore et al., 1992).

Otro aspecto importante que se ve afectado por el envejecimiento es la interacción de neurotransmisores. Estudios previos de nuestro laboratorio se han centrado en la interacción de neurotransmisores en corteza y estriado, debido al importante papel que juegan en funciones motoras, cognitivas y de motivación, funciones todas ellas que se ven alteradas por la edad (Segovia et al., 2001;Mora et al., 2008). En estos estudios se ha mostrado que el glutamato endógeno incrementa la concentración extracelular de dopamina en el estriado y el núcleo accumbens, y que este aumento se reduce con la edad de forma específica en el núcleo accumbens (Segovia et al., 1999). Agonistas metabotrópicos de glutamato producen un aumento de GABA en corteza prefrontal que también se reduce con la edad (Segovia and Mora, 2005b). Así mismo, se ha observado que la activación de diferentes receptores glutamatérgicos en el núcleo accumbens produce incrementos tanto de dopamina como de GABA, y que ambos incrementos se reducen con la edad (Segovia and Mora, 2005a). También se ha descrito que la liberación de glutamato y GABA inducida por la activación de receptores dopaminérgicos en estriado y corteza prefrontal medial disminuye con el envejecimiento (Porrás and Mora, 1995;Porrás et al., 1997).

El envejecimiento también modifica varios parámetros conductuales, por ejemplo los animales viejos muestran una menor actividad motora en un ambiente novedoso, lo que podría relacionarse con la bradiquinesia que se observa en humanos (Nyakas et al., 1992;Huang et al., 1995;Yurek et al., 1998). También se ha observado una peor realización de pruebas dependientes de memoria espacial, relacionadas con alteraciones en hipocampo, por parte de animales viejos (Kikusui et al., 1999;Shukitt-Hale et al., 2004;Lores-Arnaiz et al., 2006;Segovia et al., 2006;Jacobson et al., 2008); y de memoria de trabajo, relacionadas con la corteza prefrontal (Bimonte et al., 2003;Jacobson et al., 2008;Segovia et al., 2008a;Mizoguchi et al., 2009b).

Envejecimiento y enriquecimiento ambiental.

El envejecimiento implica múltiples factores genéticos (invariables) y ambientales (potencialmente variables) (Hibberd et al., 2000). Así, diferentes estudios

han investigado el efecto del enriquecimiento ambiental en el proceso de envejecimiento, sugiriendo que el cerebro envejecido conserva un importante grado de plasticidad (Mora et al., 2007) (fig. I2). Se han descrito efectos del enriquecimiento ambiental en animales viejos, como una menor disminución en la densidad de espinas dendríticas (Greenough et al., 1986) y un incremento en la neurogénesis de giro dentado de hipocampo (Kempermann et al., 1998; Segovia et al., 2006; Leal-Galicia et al., 2008), así como un aumento en la densidad de espinas dendríticas de cerebelo (Greenough et al., 1986) y un mantenimiento de la densidad sináptica en diversas áreas corticales (Saito et al., 1994). La gliosis que aparece en animales viejos también se reduce al mantenerlos en condiciones de enriquecimiento ambiental (Soffié et al., 1999). Los sistemas glutamatérgico y GABAérgico también se ven alterados por el enriquecimiento ambiental, ya que se ha visto que los animales viejos mantenidos en estas condiciones muestran mayores niveles tanto basales como estimulados, de ambos neurotransmisores (Segovia et al., 2006). La respuesta a estrés del sistema dopaminérgico se ve reducida con la edad, y además se ha observado que dicha respuesta es menor en los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental (del Arco et al., 2001; Segovia et al., 2008a). Así mismo, el enriquecimiento ambiental reduce la respuesta colinérgica al estrés, aún cuando ésta no parece verse afectada por el envejecimiento (Segovia et al., 2008b).

También se ha observado que los animales viejos mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental muestran una mejor memoria espacial y de trabajo (Kempermann et al., 1998; Frick and Fernandez, 2003; Fernández et al., 2004; Segovia et al., 2006; Lores-Arnaiz et al., 2006; Harburger et al., 2007; Harati et al., 2011). En cuanto al proceso neural por el que el enriquecimiento ambiental puede actuar sobre el envejecimiento, se ha observado que estos animales muestran mayores niveles de sinaptofisina en el hipocampo y en la corteza cerebral (Frick and Fernandez, 2003) y una mayor supervivencia neuronal en hipocampo (Kempermann et al., 1998; Segovia et al., 2006). Otra posibilidad para explicar la mejor realización de tareas cognitivas es la menor pérdida de neuronas colinérgicas que se observa en los animales viejos en enriquecimiento (Harati et al., 2011), que podría ser a su vez consecuencia de aumentos en la expresión de BDNF (Strasser et al., 2006; Paban et al., 2011).

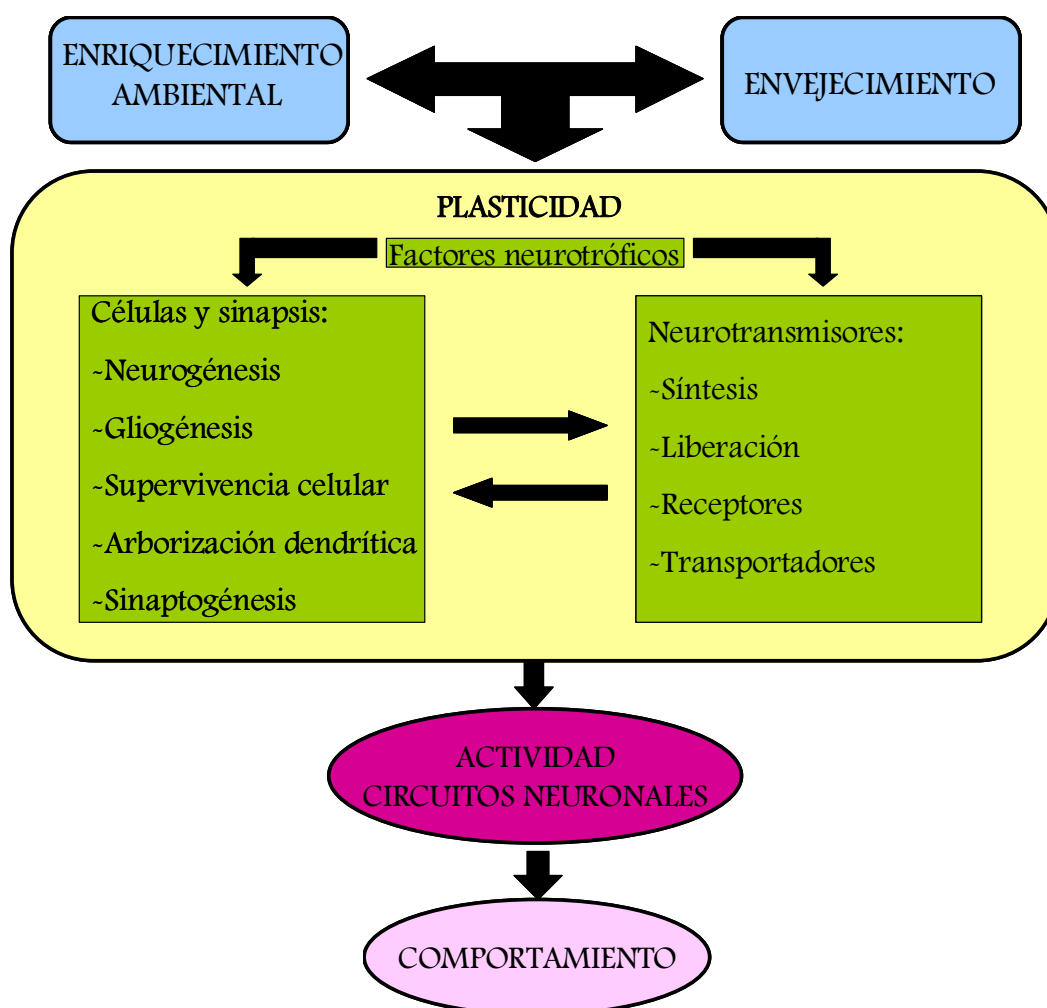


Figura I2. Diagrama que muestra el efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento, y de su interacción, sobre procesos celulares y funcionales en el sistema nervioso que en último término dan lugar a modificaciones en el comportamiento de los animales (modificado de Mora et al., 2007).

3. Estrés, glucocorticoides y neurotransmisores.

El estrés se define como una situación en la que la homeostasis del individuo está amenazada, potencial o realmente (Selye, 1976; McEwen, 2000). En respuesta a esa situación estresante, el individuo activa una serie de mecanismos neurales y hormonales para reestablecer dicha homeostasis. Aparte de la activación del sistema nervioso simpático (como fase inicial) y la liberación de adrenalina y noradrenalina por la corteza suprarrenal, uno de los aspectos más estudiados con respecto a la

respuesta a estrés es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Dicha activación produce una secreción del factor de liberación de corticotropina (CRF) por el hipotálamo que, al alcanzar la eminencia media de la hipófisis, induce la liberación de corticotropina (ACTH) a la sangre. La ACTH llega a la corteza adrenal y promueve la liberación de glucocorticoides (corticosterona en la rata y cortisol en el humano y en la mayoría de mamíferos) (Ulrich-Lai and Herman, 2009).

La corticosterona ejerce funciones sistémicas para aportar energía al organismo con la que afrontar la situación estresante. En concreto aumenta la presión sanguínea, tiene un efecto inmunosupresor y antiinflamatorio, incrementa la concentración de glucosa en sangre, favoreciendo la glucogenolisis y la gluconeogénesis en hígado, así como la lipólisis en tejido adiposo y la proteólisis en algunos tipos de músculo, e inhibe los comportamientos reproductivos (Sapolsky et al., 2000). Pero además, la corticosterona, gracias a su naturaleza lipofílica, atraviesa la barrera hematoencefálica y puede actuar sobre diversas áreas del sistema nervioso central. La corticosterona actúa mediante su unión a dos tipos de receptores: los receptores de mineralocorticoides de alta afinidad, y los receptores de glucocorticoides de baja afinidad (de Kloet et al., 2005). Estos receptores se localizan en el citoplasma celular, y una vez que su agonista se une a ellos, se translocan al núcleo donde activan o inhiben la transcripción de diversos genes (de Kloet, 2000). Los efectos fundamentales de los glucocorticoides a nivel cerebral son: aportar energía a las neuronas, modular los procesos de memoria (favoreciéndolos o inhibiéndolos) y regular el propio eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Sapolsky et al., 2000; Garrido, 2011). Además de estos efectos genómicos, la corticosterona lleva a cabo también acciones rápidas no genómicas, mediadas por receptores de membrana que aún no han sido caracterizados, pero que no deben ser muy diferentes de los citoplasmáticos descritos anteriormente (Joëls et al., 2008). Entre estos efectos se han descrito alteraciones en la excitabilidad neuronal en hipocampo, cambios en la liberación de neurotransmisores tales como glutamato y dopamina, y efectos conductuales (Sandi et al., 1996; Venero and Borrell, 1999; Wiegert et al., 2006; Herbert et al., 2006; Liu et al., 2007; Joëls et al., 2008; Tye et al., 2009).

Se ha observado que el estrés produce respuestas neuroquímicas en varias áreas del cerebro que implican diferentes sistemas de neurotransmisión. La respuesta más estudiada es la activación de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral. Esta activación tiene como consecuencia una mayor liberación de dopamina en áreas diana del sistema dopaminérgico, como son el núcleo accumbens y la corteza

prefrontal (Abercrombie et al., 1989;Imperato et al., 1989;Imperato et al., 1991;King et al., 1997;Finlay and Zigmond, 1997;Rouge-Pont et al., 1998;Feenstra et al., 1998;del Arco et al., 2001;Jackson and Moghaddam, 2004;del Arco et al., 2007b;Doherty and Gratton, 2007;Segovia et al., 2008a). Es importante destacar los estudios señalando la relación entre la respuesta neuroquímica de ambas áreas cerebrales, debido a su estrecha relación a la hora de modular las respuestas comportamentales de los animales. Así, se ha observado que el aumento de dopamina que se produce en la corteza prefrontal inhibe la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Doherty and Gratton, 1996;Finlay and Zigmond, 1997;King et al., 1997) y que el aumento de noradrenalina que se produce en la corteza prefrontal como respuesta al estrés también podría jugar un papel modulador sobre la liberación de dopamina en accumbens (Finlay and Zigmond, 1997;Feenstra et al., 1998;Pascucci et al., 2007). El papel de este aumento de catecolaminas es controvertido. Algunos autores sugieren que el aumento de dopamina en la corteza prefrontal estaría inhibiendo sus funciones para dar lugar a respuestas más automáticas (Arnsten, 1998), mientras que otros autores sugieren que la dopamina regula la función de la corteza prefrontal para favorecer una respuesta coordinada entre las diferentes áreas cerebrales límbicas (Doherty and Gratton, 1996). En general, podemos afirmar que se trata de una estrategia para optimizar la conducta del animal en respuesta al estrés.

Otro sistema de neurotransmisión que se ve afectado por el estrés es el colinérgico, ya que se le atribuye un papel fundamental en la regulación de la atención (Dalley et al., 2004;Sarter et al., 2009). Se han descrito aumentos de acetilcolina como respuesta a estrés en corteza prefrontal e hipocampo (Imperato et al., 1991;Mark et al., 1996;del Arco et al., 2007b;Segovia et al., 2008b). También se han observado aumentos de glutamato en diversas áreas como corteza prefrontal, hipocampo y neostriado en respuesta a estrés y a inyecciones sistémicas y locales de corticosterona (Keefe et al., 1993;Lowy et al., 1995;Venero and Borrell, 1999;Rutherford et al., 2007).

A pesar de estos estudios acerca del efecto del estrés sobre los diferentes sistemas neurotransmisores, el papel concreto que ejerce la corticosterona a través de sus receptores específicos sigue siendo controvertido. Por ejemplo, se ha descrito que la corticosterona aumenta la liberación de glutamato en el hipocampo (Venero and Borrell, 1999;Karst et al., 2005) y la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Piazza et al., 1996;Tye et al., 2009). También se ha descrito que la corticosterona potencia las respuestas a NMDA que se producen en el área tegmental ventral (Cho

and Little, 1999). Frente a todo ello, hay trabajos mostrando que el aumento de dopamina y de acetilcolina inducido por estrés es independiente del aumento de corticosterona (Imperato et al., 1991; Lindley et al., 1999). En el hipotálamo se ha observado que el agonista sintético de receptores de glucocorticoides dexametasona, produce una disminución de la liberación sináptica de glutamato y un aumento de la liberación sináptica de GABA, mediante la liberación retrógrada de endocannabinoides y óxido nítrico, respectivamente (Di et al., 2009).

Una vez más, hay que destacar la importancia de la interacción de los distintos neurotransmisores y las diferentes áreas cerebrales a la hora de elaborar respuestas adaptativas. En el caso concreto del estrés, ya hemos comentado cómo la interacción entre dopamina y noradrenalina en corteza prefrontal puede a su vez influir en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Finlay and Zigmond, 1997; Pascucci et al., 2007). También se ha descrito que el aumento de dopamina que se produce en accumbens como respuesta al estrés se puede inhibir si se activan los receptores metabotrópicos glutamatérgicos locales (Feenstra et al., 1998), y que se modula también por el bloqueo de receptores dopaminérgicos en amígdala (Stevenson and Gratton, 2003). Un estudio previo de nuestro laboratorio ha mostrado que el bloqueo de receptores dopaminérgicos D1 en corteza prefrontal incrementa la concentración extracelular de dopamina y acetilcolina inducidas por estrés (del Arco et al., 2011). Por otro lado, no existe acuerdo respecto al papel del glutamato en los aumentos de dopamina en corteza prefrontal inducidos por estrés, habiéndose sugerido tanto un papel estimulador como inhibidor (Takahata and Moghaddam, 1998; del Arco and Mora, 2001). Finalmente, hay que destacar que no existen estudios sobre los posibles efectos de la corticosterona sobre la interacción de neurotransmisores en diferentes áreas cerebrales.

Diferentes estudios han descrito que haber sufrido experiencias estresantes facilita la adquisición de la auto-administración de drogas y puede favorecer la recaída (Piazza and Le Moal, 1998; Wang et al., 2005; Wang et al., 2007; Yamada and Bruijnzeel, 2011). Dado que se ha propuesto que una alteración en la homeostasis de los sistemas dopaminérgicos (Willuhn et al., 2010) y glutamatérgicos (Kalivas, 2009) estarían en la base de la adicción a drogas, es posible que el estrés ejerza sus acciones a través de la modificación de estos sistemas neurotransmisores. Por ejemplo, tanto el estrés como la administración de drogas de abuso producen un incremento en la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens (Piazza and Le Moal, 1998; Der-Avakian et al., 2006). Se podría pensar que los glucocorticoides liberados al

torrente sanguíneo como respuesta a una situación de estrés y tras su entrada en el cerebro podrían interaccionar con la dopamina y otros neurotransmisores en diferentes áreas cerebrales modulando las diferentes respuestas a drogas que muestran los animales que han pasado por una situación estresante. Además, se ha observado que los glucocorticoides son capaces de modular la liberación de dopamina y glutamato (Rouge-Pont et al., 1998; Venero and Borrell, 1999), y podrían jugar un papel importante a la hora de determinar la predisposición de un individuo a auto-administrarse drogas de abuso.

Estrés y enriquecimiento ambiental.

Las condiciones ambientales en las que se desarrollan los seres vivos pueden determinar la mayor o menor vulnerabilidad de los mismos a los efectos del estrés. Las patologías relacionadas con el estrés, como la depresión o el síndrome de estrés post-traumático son complejas y multifactoriales, puesto que dependen tanto de la predisposición genética como de alteraciones en el ambiente y experiencias estresantes previas (de Kloet et al., 2005). Los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental muestran una menor respuesta ante ambientes novedosos, por lo que se ha sugerido que podrían tener un sistema de respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal más adaptativo que los animales mantenidos en condiciones control (Larsson et al., 2002; Mlynarik et al., 2004; Fox et al., 2006; Zambrana et al., 2007; Segovia et al., 2009). El vivir en un enriquecimiento ambiental previo favorece una adaptación emocional más rápida ante situaciones novedosas, lo que podría indicar que tienen menos miedo a explorar ambientes nuevos, de los que extraen información de manera más eficiente, lo que se expresa en un alto nivel exploratorio inicial y una más pronta habituación (Zimmermann et al., 2001; Schrijver et al., 2002; Larsson et al., 2002). En el contexto de la adicción a drogas, el ambiente en el que se desarrolla un individuo y sus experiencias previas juegan un papel fundamental. En este sentido, se ha descrito que los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental son menos propensos a la autoadministración de diferentes drogas de abuso y sufren menos las consecuencias de un tratamiento continuado con la droga (Bardo et al., 2001; Green et al., 2003; Solinas et al., 2008; Chauvet et al., 2009; Green et al., 2010).

El efecto del enriquecimiento ambiental sobre los niveles basales de corticosterona es controvertido, ya que se pueden encontrar trabajos que describen un aumento (Marashi et al., 2003; Moncek et al., 2004), una disminución (Belz et al.,

2003;Sztainberg et al., 2010;Garrido, 2010), o ningun cambio (Mlynarik et al., 2004;Peña et al., 2009) de los mismos debido a la variabilidad de las condiciones de los animales. Por otro lado, se ha observado que los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental muestran menores niveles de glucocorticoides durante y tras una situación estresante (Belz et al., 2003;Marashi et al., 2003;Mlynarik et al., 2004;Moncek et al., 2004;Garrido et al., 2008;Garrido, 2010), y una mayor expresión de receptores de glucocorticoides que los animales aislados (Gagné et al., 1998;Mohammed et al., 2002;Larsson et al., 2002). En cuanto al efecto del enriquecimiento ambiental sobre la respuesta neuroquímica al estrés, estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental muestran una menor respuesta dopaminérgica y colinérgica en corteza prefrontal ante estímulos estresantes (del Arco et al., 2007b;Segovia et al., 2008a;Segovia et al., 2008b). No existen, sin embargo, estudios que investiguen si la corticosterona tiene un menor efecto sobre la interacción de neurotransmisores en diferentes áreas cerebrales en los animales mantenidos en estas condiciones.

Estrés y envejecimiento.

Envejecimiento y estrés es un binomio clave en la Biomedicina en tanto que ambos parámetros suponen alteraciones en la homeostasis del individuo. De dicha relación surgió la “hipótesis de la cascada de glucocorticoides” (Sapolsky et al., 1986), que sugiere que cambios relacionados con la edad en la regulación del eje HHA producirían neurotoxicidad y muerte neuronal en hipocampo, por lo que se reduciría el control sobre la liberación de glucocorticoides que ejerce ésta área cerebral en concreto, dando lugar a una hipersecreción de estas hormonas. Hay datos que apoyan esta hipótesis, por ejemplo se ha observado que los animales viejos muestran una más lenta recuperación de los niveles basales de corticosterona tras un estímulo estresante (Sapolsky et al., 1983;Lorens et al., 1990;van Eekelen et al., 1992;Segar et al., 2009), y también se ha descrito que los niveles de corticosterona pueden producir alteraciones en los árboles y espinas dendríticas de las neuronas hipocampales (Sapolsky, 1999;McEwen, 2000;Herbert et al., 2006) y en la neurogénesis de hipocampo (Cameron and Gould, 1994;Kim and Diamond, 2002;Mirescu and Gould, 2006). Con el tiempo, la hipótesis de la cascada de glucocorticoides se ha ido modificando, y ha pasado a llamarse “hipótesis de la neurotoxicidad”, que sugiere que una exposición prolongada de las neuronas a niveles elevados de glucocorticoides reduce la capacidad de éstas para hacer frente a diversos “ataques” (Sapolsky, 1999;Hibberd et al., 2000),

confiriendo una mayor importancia a los niveles basales de corticosterona que a los incrementos agudos durante la situación de estrés (Sapolsky, 1999;Lupien et al., 2009). En este sentido, un estudio reciente de nuestro laboratorio ha mostrado que el envejecimiento incrementa los niveles basales de corticosterona en el cerebro, concretamente en corteza prefrontal e hipocampo, pero no los producidos por un estrés agudo (Garrido et al., 2010).

La respuesta neuroquímica al estrés también se modifica con la edad. En concreto, el aumento de dopamina que se produce en corteza prefrontal en respuesta a estrés se ve reducido en animales viejos (del Arco et al., 2001;Segovia et al., 2008a). Por el contrario, la respuesta colinérgica a estrés no se ve afectada por el envejecimiento, aunque sí se ve reducida por el enriquecimiento ambiental (Segovia et al., 2008b). Es interesante que tanto el envejecimiento como el enriquecimiento ambiental tienen efectos similares sobre la respuesta a estrés. Por ejemplo, la respuesta motora ante un ambiente novedoso se ve reducida por ambos factores (Zimmermann et al., 2001;del Arco et al., 2007b;Segovia et al., 2008a;Segovia et al., 2008b;Garrido et al., 2010), al igual que la respuesta dopaminérgica al estrés (Segovia et al., 2008a;Segovia et al., 2009). Esto ha llevado a plantear la hipótesis de que tanto los animales viejos como los mantenidos en enriquecimiento ambiental son capaces de controlar mejor las situaciones de estrés (Segovia et al., 2009). Esta hipótesis estaría en consonancia con estudios recientes en seres humanos que han descrito que los individuos ancianos muestran una mayor regulación emocional. Así, mediante neuroimagen han observado que en respuesta a estímulos negativos, los individuos viejos muestran una menor activación de la amígdala y una mayor activación de la corteza prefrontal, lo que sugiere que reducen las respuestas automáticas para dar más peso a respuestas controladas (St.Jacques et al., 2009;Samanez-Larkin and Carstensen, 2011).

El efecto del envejecimiento sobre la corticosterona basal plasmática de los animales sigue siendo controvertido, ya que existen tanto estudios que describen un aumento de los niveles basales con la edad (Sapolsky et al., 1983;Meaney et al., 1992), como otros que no describen ningún cambio (van Eekelen et al., 1992;Morano et al., 1994;Bizon et al., 2001;Mizoguchi et al., 2009a;Garrido et al., 2010). La respuesta a estrés sí parece estar afectada por el envejecimiento, ya que, como hemos descrito anteriormente, los animales viejos muestran una recuperación más lenta de los niveles basales de corticosterona tras un estímulo estresante (Sapolsky et al., 1983;Lorenz et al., 1990;van Eekelen et al., 1992;Segar et al., 2009). El efecto del envejecimiento

sobre los receptores de glucocorticoides, sin embargo, parece estar más claro, habiéndose observado una reducción de los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides con la edad en áreas diversas del cerebro, como hipocampo, corteza prefrontal e hipotálamo (Reul et al., 1988; Meaney et al., 1992; van Eekelen et al., 1992; Morano et al., 1994; Hassan et al., 1999; Bizon et al., 2001; Mizoguchi et al., 2009a). La reducción de los receptores de glucocorticoides en estas áreas explicaría la recuperación más lenta de los niveles tras una situación estresante, ya que son áreas relacionadas con la retroalimentación negativa que los glucocorticoides ejercen sobre la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Sin embargo, no existen estudios que se hayan centrado en el efecto que el envejecimiento puede tener sobre la acción concreta de la corticosterona a través de sus receptores específicos sobre los diferentes sistemas neurotransmisores.

4. Núcleo accumbens.

El núcleo accumbens forma parte, junto con el tubérculo olfatorio, de la estructura conocida como estriado ventral. Es una estructura fundamental en la integración límbico-motora (Mogenson et al., 1980).

El núcleo accumbens recibe aferencias de muy diversas estructuras cerebrales, en las que se ven implicados gran número de neurotransmisores:

- Aferencias glutamatérgicas: provenientes de corteza, hipocampo, amígdala y tálamo, y son las principales aferencias excitadoras (Pennartz et al., 1994; Groenewegen et al., 1999).

- Aferencias dopaminérgicas: son fundamentalmente moduladoras, y provienen de área tegmental ventral y sustancia nigra (Mogenson et al., 1980; Sesack and Pickel, 1990).

- Aferencias GABAérgicas: provienen de área tegmental ventral, y también tienen carácter neuromodulador (Sesack et al., 2003; Van Bockstaele and Pickel, 1995).

- Aferencias serotoninérgicas: provienen de los núcleos del Rafe (Mogenson et al., 1980).

- Aferencias noradrenérgicas: provenientes del locus coeruleus (Carboni and Silvagni, 2004).

El núcleo accumbens se divide en una parte más relacionada con estructuras límbicas (*shell*), y otra más relacionada con estructuras motoras (*core*). El *shell* actúa como un detector de coincidencia, activándose cuando recibe información desde

hipocampo, corteza prefrontal y amígdala, entrada modulada por los sistemas dopaminérgico desde área tegmental ventral y serotoninérgicos desde núcleos del Rafe. Una vez activado, el *shell* envía a su vez información al pálido ventral, que llega después a tálamo medio-dorsal y a corteza prefrontal dorsal. Desde ahí, la información pasa al *core* del núcleo accumbens, donde es modulada nuevamente desde sustancia nigra y núcleos del Rafe, y una vez elaborada se envía una respuesta motora al globus pallidus. Es así como se organiza la integración entre la motivación y la acción motora (Fernández-Espejo, 2000).

Las neuronas principales del núcleo accumbens son las neuronas espinosas de tamaño medio, cuyo neurotransmisor es el GABA. Estas neuronas constituyen las proyecciones del núcleo accumbens hacia otras estructuras. Además en este núcleo se localizan poblaciones de interneuronas (GABAérgicas o colinérgicas) que no presentan espinas y suelen ser más grandes que las neuronas de proyección (Mogenson et al., 1980; Smith and Bolam, 1990; Meredith et al., 1993).

La sinaptología de las neuronas del núcleo accumbens sugiere la existencia de una interacción entre los distintos sistemas de neurotransmisión concurrentes en esta área cerebral. Así, se ha descrito que las aferencias glutamatérgicas (provenientes de corteza, hipocampo y amígdala principalmente) y las dopaminérgicas (provenientes de área tegmental ventral) sinapsan sobre las mismas espinas de dendritas distales: las aferencias glutamatérgicas sinapsan sobre la cabeza de la espina y las dopaminérgicas sobre el cuello de la misma, formando las estructuras denominadas tríadas (figura I3) (Sesack and Pickel, 1990). De esta manera, la dopamina podría modular la entrada glutamatérgica. También se ha descrito que el glutamato modula la liberación de dopamina, aunque debido a la falta de contacto directo entre ambas terminaciones se ha sugerido que tal modulación podría llevarse a cabo de manera indirecta, bien extrasinápticamente, mediante transmisión volumétrica, o bien a través de circuitos polisinápticos que regulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y la sustancia nigra (Mora et al., 2008). Así mismo, en zonas más proximales de la neurona, concurren terminaciones colinérgicas de las propias interneuronas del núcleo accumbens junto con terminaciones GABAérgicas de interneuronas locales y de colaterales de las mismas neuronas espinosas de tamaño medio (Meredith et al., 1993). Esta disposición de las diferentes entradas de información a la neurona favorece la existencia de interacciones entre los diversos neurotransmisores.

Dichas interacciones están apoyadas además por la distribución de receptores para los diferentes neurotransmisores en el núcleo accumbens. Así, se ha descrito que las neuronas GABAérgicas de proyección del núcleo accumbens expresan tanto receptores dopaminérgicos (Le Moine and Bloch, 1996; Tarazi and Baldessarini, 1999; David et al., 2005) como glutamatérgicos (Tarazi et al., 1998; Tarazi and Baldessarini, 1999; David et al., 2005). También se ha descrito que los axones dopaminérgicos que llegan al núcleo accumbens expresan receptores NMDA y AMPA (Tarazi and Baldessarini, 1999), al igual que los axones glutamatérgicos provenientes de corteza cerebral y áreas subcorticales (Tarazi et al., 1998; Fujiyama et al., 2004). Además se ha observado que el núcleo accumbens expresa tanto receptores de glucocorticoides como receptores de mineralocorticoides (Zoli et al., 1990), lo que sugiere que la interacción de neurotransmisores en esta área concreta podría estar modulada por glucocorticoides. Los receptores NMDA y AMPA son canales tetraméricos que muestran diferentes propiedades según las subunidades que los formen. Los receptores AMPA están formados por cuatro tipos de subunidades: GluR1-GluR4 (o GluRA-GluRD). La mayoría de los receptores AMPA contienen la subunidad GluR2, que es la que confiere la impermeabilidad al Ca^{2+} , y según el área cerebral pueden tener una composición diferente en cuanto a las demás subunidades (Song and Huganir, 2002; Derkach et al., 2007; Traynelis et al., 2010). Por su parte, los receptores NMDA pueden estar compuestos por tres tipos de subunidades: NR1, NR2 (A-D) y NR3 (A-B), de las cuales NR1 es crucial para la formación del canal, mientras que NR2 y NR3 son importantes para las propiedades y regulación del receptor (Cull-Candy et al., 2001; Carroll and Zukin, 2002; Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Traynelis et al., 2010).

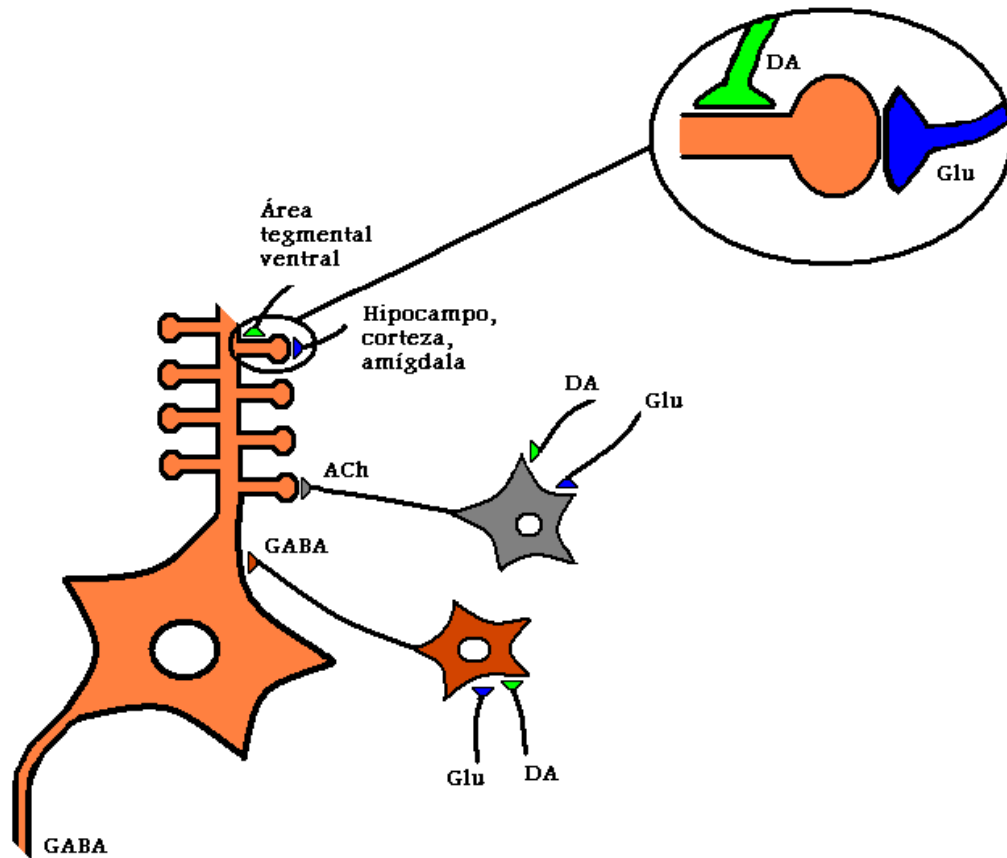


Figura I3. Esquema de la sinaptología del núcleo accumbens. Se muestra una neurona espinosa de tamaño medio (rojo claro), una interneurona colinérgica (gris) y una interneurona GABAérgica (rojo oscuro). (DA: dopamina; Glu: glutamato; ACh: acetilcolina).

Núcleo accumbens y enriquecimiento ambiental.

Se ha observado que el núcleo accumbens es sensible al enriquecimiento ambiental, ya que se ha descrito un aumento en la longitud y arborización dendrítica y la densidad de espinas de las neuronas espinosas de tamaño medio de animales mantenidos en estas condiciones (Kolb et al., 2003b; Hamilton and Kolb, 2005). Por otro lado, se ha visto que el enriquecimiento ambiental y algunas drogas de abuso tienen efectos celulares comunes sobre el núcleo accumbens, ya que ambos producen aumentos en la longitud dendrítica y aumento en la densidad de espinas en las neuronas del núcleo accumbens (Kolb et al., 2003a; Kolb et al., 2003b). También se sabe que los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental muestran una mayor respuesta motora y neuroquímica (mayor liberación y metabolismo de dopamina en accumbens) ante una inyección aguda de amfetamina (Bowling et al., 1993; Bardo et al., 2001; Green et al., 2003) en comparación con los animales mantenidos en condiciones control. Un estudio previo de nuestro laboratorio

ha mostrado que los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental muestran mayores niveles basales y estimulados de dopamina en el núcleo accumbens (Segovia et al., 2010). Sin embargo, también se ha descrito que son menos propensos a auto-administrarse anfetamina y cocaína, y sufren menos los efectos de sensibilización relacionados con un tratamiento continuado con la droga (Bardo et al., 2001;Green et al., 2003;Solinas et al., 2008;Chauvet et al., 2009;Green et al., 2010). Además, son animales menos impulsivos, comportamiento estrechamente relacionado con la adicción a drogas (Dalley et al., 2007;Perry et al., 2008).

Núcleo accumbens y envejecimiento.

El núcleo accumbens también sufre cambios neuroquímicos específicos durante el envejecimiento. Así, estudios previos de nuestro laboratorio han descrito que el aumento de dopamina producido por un aumento del glutamato endógeno en accumbens se ve reducido con la edad (Segovia et al., 1999). Así mismo, la activación específica de receptores locales NMDA y AMPA produce un aumento de dopamina y GABA en el núcleo accumbens que también se reduce en animales viejos (Segovia and Mora, 2005a). Estos cambios podrían explicar en parte la menor actividad motora que muestran las ratas viejas, que sería equivalente a la bradiquinesia que se observa en los seres humanos con la edad (Nyakas et al., 1992;Huang et al., 1995;Yurek et al., 1998), ya que se ha mostrado que tanto la dopamina como el glutamato locales son importantes para la función motora (Brudzynski and Gibson, 1997;Taepavarapruk et al., 2000;David et al., 2005).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Las condiciones ambientales y los estilos de vida juegan un papel fundamental a la hora de modular la adaptación al medio y a los diversos cambios que en él se producen, y cada día cobra mayor relevancia el papel que el ambiente puede jugar en la aparición de diversas patologías neurológicas y psiquiátricas (Nithianantharajah and Hannan, 2006;Laviola et al., 2008). Esto es posible ya que el ambiente puede producir una serie de cambios en la plasticidad neuronal que a su vez afectan a la estructura y función del sistema nervioso. Una aproximación experimental para estudiar los cambios que el ambiente produce sobre los diversos parámetros del sistema nervioso es el enriquecimiento ambiental (Mora et al., 2007).

El enriquecimiento ambiental es una modificación de las condiciones de vida de los animales que consiste en un incremento en la estimulación social, sensorial y motora de los mismos. Se ha descrito que mantener a los animales en estas condiciones produce una serie de cambios morfológicos en el sistema nervioso, como son un mayor volumen cerebral, una mayor densidad de espinas dendríticas en las neuronas hipocámpales (Mohammed et al., 2002), además de promover la supervivencia neuronal, la angiogénesis y la sinaptogénesis (Kempermann et al., 1997;van Praag et al., 2000;Segovia et al., 2006). El mantenimiento de los animales en estas condiciones produce también cambios en diversos sistemas neuroquímicos, tales como el dopaminérgico (Bowling et al., 1993;Zhu et al., 2005;Segovia et al., 2008a;Segovia et al., 2010) o el glutamatérgico (Segovia et al., 2006). En consonancia con estos cambios, se han observado cambios en las capacidades cognitivas de los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, entre los que destaca un aumento en la capacidad de aprendizaje y memoria (Mora et al., 2007).

La cambiante demografía de nuestra sociedad, y la creciente esperanza de vida, han hecho que cobren relevancia los estudios sobre el envejecimiento, sobre todo los relacionados con el envejecimiento del cerebro y sus funciones. El envejecimiento produce cambios en el sistema nervioso, como una reducción en la densidad sináptica (Saito et al., 1994;Terry and Katzman, 2001) y una menor neurogénesis que en animales jóvenes (Segovia et al., 2006). Los sistemas de neurotransmisión también se ven afectados, en especial la dopamina, ya que se ha descrito que el envejecimiento produce una disminución del contenido de dopamina en el estriado (Joseph et al., 1990;Makman, 1993;Míguez et al., 1999), una menor concentración extracelular basal en el estriado y el núcleo accumbens (Gerhardt and Maloney, 1999;Segovia et al., 1999) y una menor liberación de dopamina en el núcleo accumbens en respuesta a potasio (Friedemann and Gerhardt, 1992;Gerhardt and Maloney, 1999). También se

ha descrito una disminución de receptores dopaminérgicos D1 y D2 en estriado (Joseph et al., 1990;Makman, 1993). Además se ha observado que la liberación de dopamina en corteza prefrontal en respuesta a estrés disminuye con la edad (del Arco et al., 2001). Otro aspecto importante que se ve afectado por el envejecimiento es la interacción de neurotransmisores. Estudios previos de nuestro laboratorio se han centrado en la interacción de neurotransmisores en corteza cerebral y estriado, debido al importante papel que juegan en funciones motoras, cognitivas y de motivación, funciones todas ellas que se ven alteradas por la edad (Segovia et al., 2001). Así, se ha descrito que el glutamato, a través de receptores específicos, incrementa la concentración extracelular de dopamina y GABA en el núcleo accumbens, y que este aumento se reduce con la edad (Segovia et al., 1999;Segovia and Mora, 2005a;Mora et al., 2008). En la corteza prefrontal se ha observado que los agonistas metabotrópicos glutamatérgicos producen un aumento en la concentración extracelular de GABA, y que este aumento se reduce con la edad (Segovia and Mora, 2005b).

El envejecimiento implica múltiples factores genéticos (invariables) y ambientales (potencialmente variables) (Hibberd et al., 2000). Se sabe que el enriquecimiento ambiental puede modificar algunos de los efectos del envejecimiento, por ejemplo, los animales viejos mantenidos en enriquecimiento muestran una menor disminución de la densidad sináptica asociada a la edad (Saito et al., 1994), una mayor neurogénesis (Kempermann et al., 1998;Segovia et al., 2006;Leal-Galicia et al., 2008) y una menor gliosis que los animales viejos mantenidos en condiciones control (Soffié et al., 1999). Las alteraciones producidas por la edad en los sistemas de neurotransmisión (Segovia et al., 2006) y en las tareas cognitivas (Kempermann et al., 1998;Segovia et al., 2006;Harati et al., 2011) también se ven atenuadas mediante el mantenimiento de los animales en enriquecimiento ambiental.

El estrés se define como una situación en la que la homeostasis del individuo está amenazada, real o potencialmente (Selye, 1976;McEwen, 2000). En estas condiciones, se activan una serie de mecanismos para reestablecer dicha homeostasis. El mecanismo más estudiado es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, que, en último término, produce la liberación de glucocorticoides (corticosterona en la rata). La corticosterona ejerce una acción sistémica para aportar energía al organismo (Sapolsky et al., 2000), y además atraviesa la barrera hematoencefálica y ejerce acciones genómicas a través de sus receptores citosólicos (de Kloet, 2000), y acciones rápidas mediadas por receptores de membrana que aún no han sido

caracterizados (Joëls and Baram, 2009). Entre esos efectos rápidos de la corticosterona se encuentran los ejercidos sobre neurotransmisores, por ejemplo se ha descrito que el estrés produce aumentos de dopamina en el núcleo accumbens (Abercrombie et al., 1989;Rouge-Pont et al., 1998;Doherty and Gratton, 2007) y en la corteza prefrontal (Abercrombie et al., 1989;del Arco et al., 2001;del Arco et al., 2007;Segovia et al., 2008a). La corticosterona también produce aumentos de glutamato en hipocampo (Lowy et al., 1995;Karst et al., 2005).

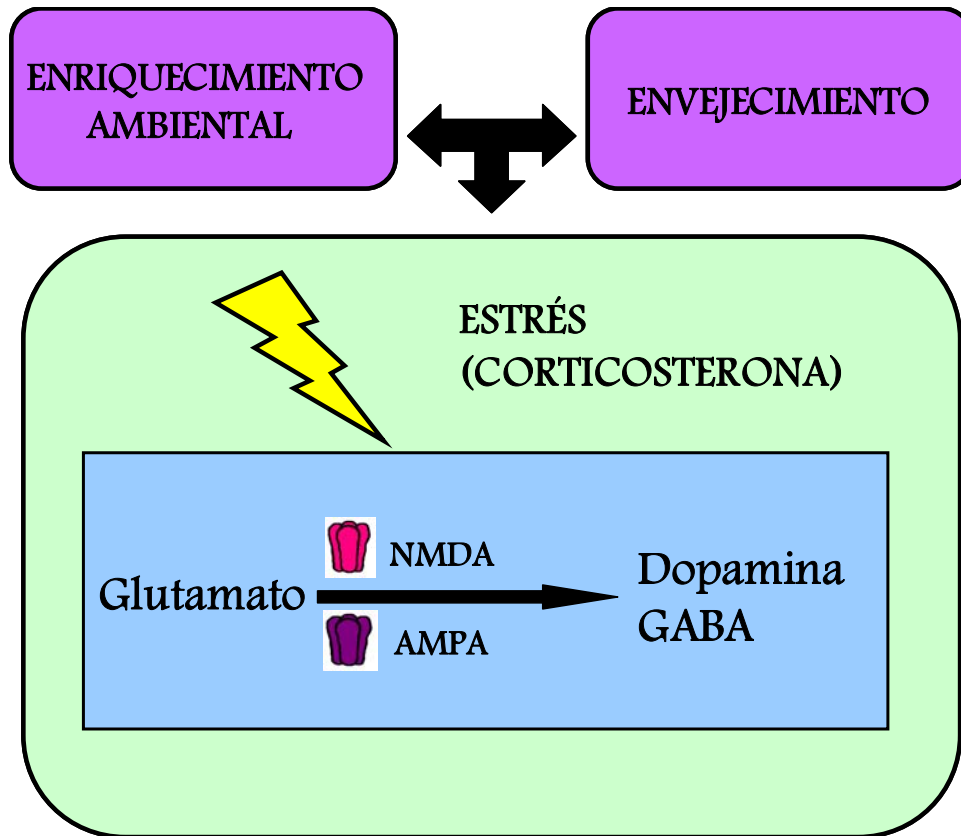
Las condiciones ambientales en las que se desarrollan o viven los individuos pueden determinar la mayor o menor vulnerabilidad de los mismos a los efectos del estrés (de Kloet et al., 2005;Sandi and Pinelo-Nava, 2007). En este sentido, los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental muestran una menor liberación de corticosterona durante y tras la exposición a estímulos estresantes (Mlynarik et al., 2004;Moncek et al., 2004;Garrido, 2010), así como una menor actividad motora en respuesta a un ambiente novedoso (Zimmermann et al., 2001;del Arco et al., 2007;Segovia et al., 2008a;Segovia et al., 2008b;Segovia et al., 2010). Sin embargo, no se ha estudiado si el enriquecimiento ambiental modifica el efecto que la corticosterona puede ejercer sobre sus receptores en el cerebro.

Por otro lado, se ha tratado de relacionar envejecimiento y estrés ya que ambos parámetros suponen alteraciones en la homeostasis del individuo. Se ha observado que el envejecimiento reduce las consecuencias fisiológicas y cognitivas de los animales de experimentación y los seres humanos al ser sometidos a un estímulo estresante (Seif et al., 2004;Kudielka et al., 2004). En cuanto a la respuesta neuroquímica al estrés, trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que el estrés produce un aumento en la concentración extracelular de dopamina en la corteza prefrontal, y que este aumento es menor en ratas viejas que en jóvenes (del Arco et al., 2001). Así mismo, se ha observado que el envejecimiento reduce la respuesta dopaminérgica a estrés en la corteza prefrontal, pero no la colinérgica (Segovia et al., 2008a;Segovia et al., 2008b;Segovia et al., 2009;Garrido, 2010) y que el enriquecimiento ambiental no modifica este efecto del envejecimiento, pero sí reduce a su vez la respuesta tanto dopaminérgica como colinérgica frente al estrés (Segovia et al., 2008a;Segovia et al., 2008b;Segovia et al., 2009;Garrido, 2010).

En cuanto al efecto del envejecimiento sobre la corticosterona, éste es controvertido respecto a sus niveles basales (Sapolsky et al., 1983;Meaney et al., 1992;van Eekelen et al., 1992;Bizon et al., 2001;Mizoguchi et al., 2009), pero se ha

descrito que los animales viejos muestran una recuperación más lenta de los niveles basales de corticosterona tras un estímulo estresante (Sapolsky et al., 1983; Lorens et al., 1990; van Eekelen et al., 1992; Segar et al., 2009). El envejecimiento reduce la expresión de receptores de glucocorticoides y de mineralocorticoides en diversas áreas cerebrales, como hipocampo, corteza prefrontal e hipotálamo (Reul et al., 1988; Meaney et al., 1992; van Eekelen et al., 1992; Morano et al., 1994; Hassan et al., 1999; Bizon et al., 2001; Mizoguchi et al., 2009). Sin embargo, no existen estudios centrados en el efecto del envejecimiento sobre la acción que la corticosterona ejerce sobre los diferentes sistemas neurotransmisores. Por tanto, es interesante investigar si las acciones de la corticosterona a través de sus receptores podrían cambiar durante el envejecimiento, independientemente de los niveles fisiológicos que se alcanzan durante el estrés.

El núcleo accumbens, área que se ha descrito como un interfaz límbico-motor (Mogenson et al., 1980), es un área importante para el estudio del efecto del enriquecimiento ambiental sobre las acciones de los glucocorticoides modulando la interacción de neurotransmisores. Por un lado, la sinaptología del núcleo accumbens sugiere que existe una interacción entre los diversos sistemas de neurotransmisores (glutamato-dopamina-GABA) que convergen en dicha área cerebral (Smith and Bolam, 1990; Mora et al., 2008). Por otro lado, los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental son menos propensos a la autoadministración de diferentes drogas de abuso (Bardo et al., 2001; Solinas et al., 2009; Stairs and Bardo, 2009), lo que podría estar relacionado con el efecto facilitador que el estrés tiene sobre la adicción a drogas (Piazza and Le Moal, 1998; Wang et al., 2005; Wang et al., 2007; Yamada and Bruijnzeel, 2011). En este sentido, el núcleo accumbens podría ser el sustrato neurobiológico de estos efectos del enriquecimiento ambiental, dado que se ha descrito que tanto el estrés como las drogas de abuso modifican la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisores en esta área cerebral (Kalivas, 2009; Stairs and Bardo, 2009).



En base a todos estos datos, la hipótesis que se propone en la presente Tesis Doctoral consistió en que el enriquecimiento ambiental modifica la posible modulación por glucocorticoides de la interacción entre neurotransmisores que ocurre en el núcleo accumbens, y que esta modificación varía con la edad.

Los objetivos concretos del presente trabajo fueron:

1. Estudiar el efecto del enriquecimiento ambiental sobre la respuesta a la coperfusión local de agonistas glutamatérgicos y corticosterona (CORT) en el núcleo accumbens de la rata despierta, en animales de 6 meses de edad.

1.1. Efecto de la perfusión de NMDA (500 μ M), NMDA+CORT (50ng/ml) y NMDA+CORT (600ng/ml) sobre la concentración extracelular de dopamina y GABA, así como sobre la actividad motora.

- 1.2. Efecto de la perfusión de AMPA (100 μ M), AMPA+CORT (50ng/ml) y AMPA+CORT (600ng/ml) sobre la concentración extracelular de dopamina y GABA, así como sobre la actividad motora.

2. Estudiar el efecto del envejecimiento y del enriquecimiento ambiental sobre la respuesta a la coperfusión local del agonista glutamatérgico NMDA y corticosterona en el núcleo accumbens de la rata despierta.
 - 2.1. Efecto de la perfusión conjunta de NMDA (500 μ M) y corticosterona (600ng/ml) sobre la concentración extracelular de dopamina y GABA, y sobre la actividad motora, en animales de 15 meses.
 - 2.2. Efecto de la perfusión conjunta de NMDA (500 μ M) y corticosterona (600ng/ml) sobre la concentración extracelular de dopamina y GABA, y sobre la actividad motora, en animales de 27 meses.

3. Estudiar el efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de ARNm de diversos receptores (diferentes subunidades de receptores NMDA y AMPA, y receptores de glucocorticoides).

4. Estudiar el efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la actividad motora espontánea.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales:

Los animales empleados en este estudio fueron ratas Wistar macho adultas (Harlan Laboratories Inc., Estados Unidos), de 3, 12 y 24 meses de edad, mantenidas en condiciones constantes de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) y en ciclo invertido de 12h luz/oscuridad (luces encendidas a las 20:00h).

Los animales fueron separados en dos grupos experimentales:

- Grupo control: los animales son mantenidos en jaulas individuales, con comida y bebida *ad libitum*.

- Grupo de enriquecimiento ambiental: los animales se mantienen en grupos de 10-12 individuos, en jaulas grandes (120x100x60cm) de metacrilato con ruedas de ejercicio, tuberías cuya disposición varía semanalmente y una serie de objetos de plástico que se renuevan semanalmente, con comida y bebida *ad libitum*.

Los animales fueron mantenidos en estas condiciones durante tres meses, por lo que la edad final de cada uno de los grupos de experimentación fue de 6, 15 ó 27 meses.

Todos los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio siguen las regulaciones españolas para la protección de animales de laboratorio (RD1201/2005).

2. Experimentos de perfusión intracerebral *in vivo* (microdiálisis):

2.1. Construcción de implantes:

Para la realización de experimentos de microdiálisis se implanta en el cerebro de la rata un sistema bilateral de cánulas guía que consiste en un implante macho-hembra de metacrilato y nailon respectivamente, diseñado en nuestro laboratorio (Segovia et al., 1997) y construido en el Taller de Asistencia Técnica a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid (Facultad de Ciencias Físicas). La implantación de cánulas guía en comparación con la implantación directa de la cánula de microdiálisis permite una mejor recuperación del animal tras la cirugía, ya que el periodo entre la operación y el experimento es mayor (de Groote and Linthorst, 2007).

La pieza de nailon presenta dos orificios en su base, en los que se insertan sendas cánulas guía de acero inoxidable de 20ga de diámetro externo y $660\mu\text{m}$ de diámetro interno. La distancia que separa estas cánulas, así como su longitud, dependen del área de estudio elegida. En este caso, para el núcleo accumbens, la separación es de

3.2mm, y la longitud 10mm. Tras insertarse las cánulas guía en sus orificios correspondientes, se fijan con una capa de pegamento (SuperGlue3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España) que permite colocarlas en su posición correcta (paralelas entre sí y perpendiculares al plano de la base de la pieza) y con resina epoxi (Araldit®, Ceys S.A., España). Las cánulas guía se mantienen libres de residuos mediante la inserción de dos cánulas de acero inoxidable, denominadas fiadores, de 24ga de diámetro externo y una longitud de 11mm. Estos fiadores se extraerán antes de realizar el experimento de microdiálisis para poder insertar la cánula.

La pieza de metacrilato presenta dos orificios que están alineados con los orificios de la pieza de nailon, para permitir la inserción de la cánula de microdiálisis. Ambas piezas poseen orificios laterales que permiten la inserción de un tornillo que asegura la inmovilización de la cánula de microdiálisis (fig. M2).

Una segunda pieza de metacrilato, con la misma forma que la anterior, pero hueca y sin agujeros, se utiliza como tapa, para evitar la pérdida de los fiadores.

2.2. Construcción de cánulas de microdiálisis:

Las cánulas de microdiálisis fueron diseñadas y construidas en nuestro laboratorio, y son de diseño concéntrico (Segovia et al., 1997). Los materiales necesarios para su construcción son los siguientes:

- capilar de silica de 144µm de diámetro externo y 75µm de diámetro interno, y una longitud aproximada de 55mm.
- cánula de acero inoxidable de 640µm (23ga) de diámetro externo, 340µm de diámetro interno y 10mm de longitud.
- cánula de acero inoxidable de 460µm (26ga) de diámetro externo, 254µm de diámetro interno y 45mm de longitud.
- cánula de acero inoxidable de 910µm (20ga) de diámetro externo, 600µm de diámetro interno y 5mm de longitud.
- extremo final de una punta de pipeta amarilla.
- membrana de diálisis de cuprofano (Hospal, España) de 200µm de diámetro, 10mm de longitud y un tamaño de exclusión molecular de 5000Da.

Los pasos para construir las cánulas de microdiálisis son los siguientes (ver figura M1):

- a) se introduce la sílica a través de la cánula de 23ga y se fija mediante pegamento (SuperGlue3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España) de modo que la sílica sobresalga 1mm por uno de los extremos de la cánula.
- b) se acoda la cánula de 26ga con un ángulo de unos 40° a una distancia aproximada de 10mm de uno de los extremos, y se realiza un orificio a la altura del codo con ayuda de la lima y una aguja.
- c) se introduce el extremo de mayor longitud de la sílica por el orificio practicado en el codo, sin que la cánula de 23ga llegue a contactar con la de 26ga. Se tapona el orificio mediante pegamento (SuperGlue3 gel®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España).
- d) se corta un pequeño fragmento de la punta de pipeta, formando una ranura. Se introduce la punta de pipeta por el extremo inferior de la cánula de 23ga y se hace coincidir el extremo acodado de la cánula de 26ga en la ranura practicada en la punta. Se rellena totalmente la punta de pipeta con pegamento (SuperGlue 3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España).
- e) se coloca la cánula de 20ga sobre el extremo sobresaliente de la cánula de 26ga, sin que llegue al extremo y se fija con pegamento (SuperGlue 3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España).
- f) bajo la lupa, se corta el extremo de la sílica de manera que sobresalga 2.5mm desde el extremo de la cánula de 26ga. Se introduce la membrana por fuera de la sílica y por dentro de la cánula de 26ga dejando que sobresalga 1mm a partir del extremo de la sílica.
- g) se fija la membrana a la cánula de 26ga mediante pegamento (SuperGlue 3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España) y se sella el extremo mediante un tapón de 0.5mm de pegamento (SuperGlue 3®, Loctite, Henkel Ibérica S.A., España).
- h) se ajusta la longitud de la cánula (20-20.5cm de longitud en el caso de núcleo *accumbens*) mediante la inserción de un polietileno de 20ga, cortado a la longitud requerida, por debajo de la punta de pipeta.

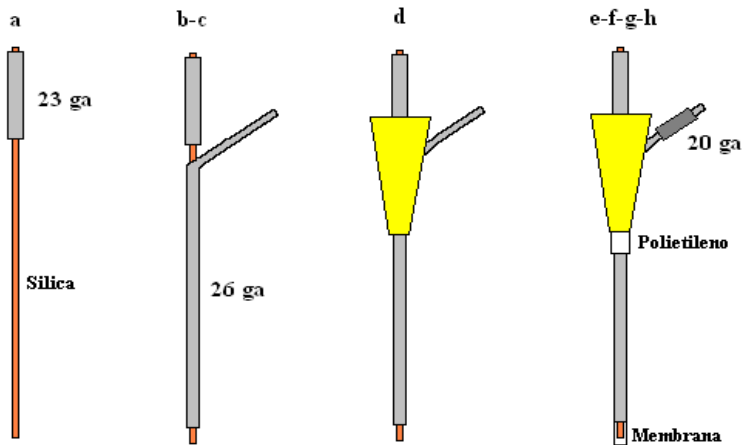


Figura M1. Construcción de las cánulas de microdiálisis.

Para la inserción de la cánula de microdiálisis en el tejido cerebral el día del experimento se siguen los siguientes pasos (figura M2):

1. Se introduce la cánula en el orificio de la pieza de metacrilato correspondiente al hemisferio en el que se va a realizar el experimento, cuidando de mantener la membrana protegida dentro de la pieza.
2. Se acopla la pieza macho dentro de la pieza hembra y se hace descender la cánula de microdiálisis hasta la profundidad adecuada.
3. Se fija la cánula mediante la inserción de un tornillo lateral.

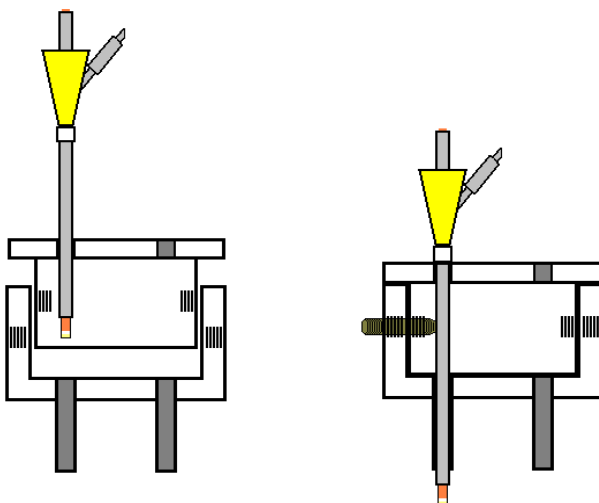


Figura M2. Inserción de la cánula de microdiálisis.

2.3. Cirugía estereotáxica:

El sistema bilateral de cánulas guía se implanta en el cerebro mediante un aparato estereotáxico que permite colocarlo en las coordenadas apropiadas. Para ello el animal debe ser anestesiado previamente. En nuestro laboratorio se utiliza el anestésico Equithesin, inyectado intraperitonealmente, a una dosis de 4ml/kg. El Equithesin se prepara disolviendo 21.25g de hidrato de cloral (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) en 49.4ml de etanol absoluto (Panreac Química S.A.U., España) y añadiendo de manera secuencial 4.86g de pentobarbital sódico (Fagron Ibérica S.A.U., España) disuelto en 21ml de agua ultrapura (sistema de purificación Milli-Q Plus®, Merck Millipore, Alemania), 198ml de 1,2-propilenglicol (Panreac Química S.A.U., España) y 10.63g de sulfato magnésico (Merck, Alemania) disuelto en 50ml de agua ultrapura (sistema de purificación Milli-Q Plus®, Merck Millipore, Alemania). Finalmente, se enrasa hasta 500ml con agua ultrapura (sistema de purificación Milli-Q Plus®, Merck Millipore, Alemania). La solución se conserva a temperatura ambiente en un recipiente opaco y cerrado.

Una vez que el animal está anestesiado (cuando pierde el reflejo corneal) se rasura la zona de la operación con una maquinilla eléctrica para cortar el pelo (Andis Company, Estados Unidos). Tanto el implante como el instrumental quirúrgico se mantienen en una solución antiséptica de cloruro de benzalconio (Arnil 1:1000, S.I.F.S.A., España) durante toda la operación.

Se coloca al animal en el aparato estereotáxico (David Kopf Instruments 900, Estados Unidos) y se fija el maxilar superior a 3.3mm por debajo de la línea interaural en el caso de animales jóvenes, y 4mm por debajo de la línea interaural en el caso de animales viejos. Se realiza una incisión con un bisturí (Aesculap® BB515, Alemania) en la piel de la cabeza, dejando al descubierto la calota del animal. Se abre el campo quirúrgico mediante pinzas hemostáticas modelo Diffenbach® (AgnTho's AB, Suecia) y se controla la hemorragia causada por el corte con papel hemostático Espongostan Film® (Ferrosan, Dinamarca). Se localiza el punto bregma (punto de unión entre las suturas interparietal y frontoparietal), que se utiliza como referencia para calcular las coordenadas estereotáxicas antero-posterior y lateral según el atlas estereotáxico Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1998). A partir de bregma las coordenadas del núcleo accumbens son +1.6mm en el eje antero-posterior y ± 1.6 mm en el eje lateral. Se coloca el implante en el brazo del estereotáxico y se lleva a su emplazamiento correcto. Se hace descender el implante hasta la calota del animal, que se usará como referencia para la coordenada de profundidad (-4mm). A continuación

se retira el implante de la zona de operación y se realizan 3 orificios (uno anterior y dos posteriores al implante) para los tornillos de fijación de 1mm de diámetro y dos orificios a través de los cuales descenderán las cánulas guía del implante. Todos los orificios se realizan con la ayuda de un taladro dental DESK 300IN (Silfraden, Italia) con una broca de 1mm (Meisinger, Alemania). A continuación, se coloca el implante de nuevo en su lugar y se hace descender lentamente hasta su emplazamiento exacto. Una vez colocado, se fija con resina autopolimerizable Dentalon Plus® (Heraeus Kulzer, Alemania), de forma que ésta rodee tanto el implante como los tornillos de fijación. Se espera un par de minutos hasta que la resina se endurezca y se retira al animal del aparato estereotáxico. Se introducen los fiadores para evitar el bloqueo de las cánulas guía por hemorragia o restos de tejido. Tras la operación quirúrgica se controla el peso de los animales y el estado de la herida.

2.4. Sistema de perfusión intracerebral *in vivo* (microdiálisis):

La perfusión intracerebral o microdiálisis es una técnica que permite la recogida de sustancias químicas presentes en el espacio extracelular (Robinson and Justice, 1991), y que consiste en la perfusión continua de líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs) a través de una cánula de microdiálisis. Esta cánula tiene en su extremo una membrana semi-permeable que permite el paso de determinadas sustancias a favor de gradiente de concentración. Las muestras obtenidas (perfundidos) serán posteriormente analizadas para la detección de diversas sustancias químicas.

Transcurridos 6-7 días tras la intervención quirúrgica, se llevan a cabo los experimentos de microdiálisis, siempre durante la fase de oscuridad del ciclo de los animales (hora de comienzo de los experimentos: 9-10am).

La composición del LCRs utilizado fue la siguiente: NaCl (Panreac Química S.A.U., España) 137mM, KCl (Merck, Alemania) 3mM, CaCl₂ (Merck, Alemania) 2.4mM, MgSO₄ (Merck, Alemania) 1mM, NaH₂PO₄ (Panreac Química S.A.U., España) 0.5mM, Na₂HPO₄ (Merck, Alemania) 2mM y glucosa (Merck, Alemania) 3mM; todo ello diluido en agua ultrapura (sistema de purificación Milli-Q Plus®, Merck Millipore, Alemania) con un pH 7.4.

El sistema de perfusión utilizado consta de los siguientes elementos (figura M3):

- bomba de infusión Harvard 22 (Estados Unidos).
- dos jeringas Hamilton (Suiza) de 1ml.
- una válvula Harvard HV 4-4 (Estados Unidos) de cuatro vías.
- un soporte giratorio o *swivel* de dos canales TCS 2-23 (AgnTho's AB, Suecia), que se une a la caja de microdiálisis y al animal.

- tubos de etileno propileno fluorizados (FEP Teflon®, AgnTho's AB, Suecia) con un diámetro externo de 23ga.
- adaptadores para tubos FEP (AgnTho's AB, Suecia).

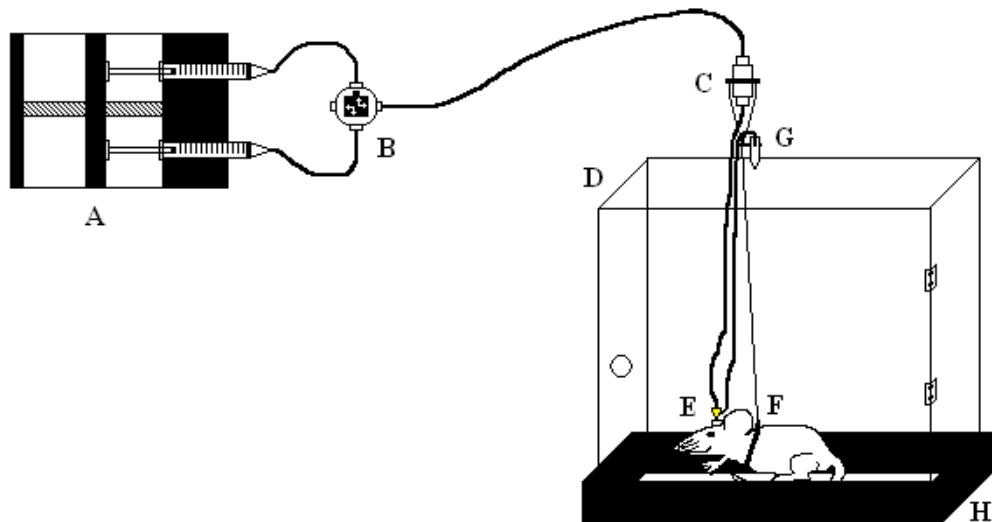


Figura M3: sistema de perfusión intracerebral *in vivo*. (A) bomba de perfusión; (B) válvula; (C) *swivel*; (D) jaula de microdiálisis; (E) cánula de microdiálisis; (F) “cinturón” de anclaje del animal; (G) recogida de la muestra; (H) bastidor de actividad motora.

Para llevar a cabo los experimentos de microdiálisis, se sujeta levemente al animal, se le quita la tapa del implante y se procede a la extracción de los fiadores. Una vez hecho esto, se perfunde LCRs a través de la cánula de microdiálisis para crear una presión hidrostática sobre la membrana que impida su rotura durante la inserción a través de la cánula guía. El método de inserción de la cánula ha sido descrito anteriormente (ver figura M2). Una vez fijada la cánula, se ancla el animal al sistema mediante una brida de plástico flexible (“cinturón”) que lo une al *swivel* y le permite moverse libremente por la jaula.

El flujo al que se perfunde el LCRs es de $2\mu\text{l}/\text{min}$, recogándose muestras cada 20min (40 μl de volumen final). Las muestras se dividen en diferentes fracciones que se almacenan a -80°C hasta su análisis, permitiendo estudiar diversas sustancias químicas a partir de la misma muestra: 6 μl se destinan al análisis de aminoácidos y 24 μl al análisis de dopamina.

2.5. Protocolo de perfusión:

El diseño del protocolo de perfusión fue el siguiente:

- Periodo de estabilización (180min): comienza tras la inserción de la cánula. Durante este periodo no se recogen muestras, ya que es el tiempo necesario para que los niveles de neurotransmisores se estabilicen tras insertar la cánula en el tejido cerebral.
- Periodo basal (60min): se recogen tres muestras que se utilizarán posteriormente como referencia de los niveles basales de los diversos neurotransmisores.
- Periodo de perfusión de la droga (40min): se perfunde la droga correspondiente diluida en LCRs. El flujo de LCRs a través de la cánula no se detiene en ningún momento gracias a la válvula de cuatro vías.
- Periodo post-droga (140min): se vuelve a perfundir LCRs, y se estudian los efectos que la perfusión de la droga puede tener sobre la concentración de neurotransmisores.

Estabilización	Basal	Droga	Post-droga
180min	60min	40min	140min

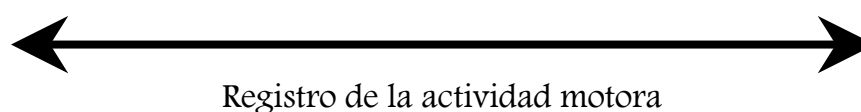


Figura M4. Protocolo de perfusión.

2.6. Preparación de drogas:

Para estudiar la interacción de neurotransmisores en el núcleo accumbens se procede a la perfusión local a través de la cánula de microdiálisis de los agonistas glutamatérgicos NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) y AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos). Las dosis a utilizar se eligieron en base a estudios previos de nuestro laboratorio (Segovia and Mora, 2005), siendo 500 μ M para NMDA y 100 μ M para AMPA, al ser éstas las más eficaces a la hora de producir una respuesta en los sistemas de neurotransmisión a estudiar (dopamina y GABA).

Las dosis de corticosterona (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) utilizadas son 50 y 600ng/ml en el caso de los animales jóvenes, y 600ng/ml en el caso de los animales medios y viejos. La dosis de 600ng/ml permite alcanzar en el tejido cerebral una concentración de corticosterona similar a la alcanzada durante un estrés moderado (Venero and Borrell, 1999).

Tanto el NMDA como el AMPA son preparados a partir de soluciones madre almacenadas a -80°C . La corticosterona es pesada el mismo día del experimento y disuelta en etanol absoluto. Todas las drogas son disueltas en LCRs, de forma que la concentración final de etanol en todos los casos es del 0,01%.

2.7. Medida de la actividad motora:

Para medir la actividad motora espontánea se utilizan unos bastidores de células fotoeléctricas (Figura M3, H) que se colocan alrededor de las jaulas de microdiálisis una vez que el animal está conectado al sistema de perfusión. Cada bastidor consta de dos filas de 8 células fotoeléctricas en dos lados consecutivos. La actividad total se evalúa como la suma total de las interrupciones de los haces emitidos por las 16 células de cada jaula cada 20min. La medida de la actividad motora se lleva a cabo utilizando el programa informático Actim 16X (Cibertec, S.A., España).

El registro de la actividad motora se inicia una hora antes del inicio del periodo basal, y se mantiene hasta finalizar el experimento (Figura M4), para poder evaluar el efecto de las diferentes drogas sobre la actividad motora.

2.8. Análisis de neurotransmisores por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

2.8.1. Detección de catecolaminas:

La detección de catecolaminas (dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA) se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa acoplada a un detector electroquímico siguiendo el método empleado en nuestro laboratorio en estudios previos (Segovia et al., 1997; Segovia and Mora, 1998; Segovia et al., 1999). El volumen de muestra necesario para el análisis de catecolaminas fue de 20 μl , que se inyectaron mediante un inyector automático refrigerado (4°C) (HP Series 1200, Hewlett-Packard, Estados Unidos), pasando a través de una columna C18 Nova-Pak® (Waters, Estados Unidos), que presenta un tamaño de partícula de 4 μm , 3.9mm de diámetro y 150mm de longitud.

La detección de catecolaminas se realiza mediante un detector electroquímico Coulochem II, modelo 5200 (ESA, Estados Unidos) que consta de dos células analíticas (ESA 5011): la célula 1 o de oxidación se fija a +375mV, con una sensibilidad de 2 μA y la célula 2 o de reducción se fija a -250mV , con una sensibilidad de 1nA. Se

emplean dos células analíticas debido a la diferencia de concentración entre la dopamina y sus metabolitos.

El cálculo de los tiempos de retención y de la cuantificación de las catecolaminas presentes en la muestra se realiza mediante un programa informático (Millenium® 32, Waters, Estados Unidos) siguiendo el método de estándar externo.

2.8.1.1. Condiciones cromatográficas:

La separación de catecolaminas se lleva a cabo mediante un sistema desgasificador de bombeo HP Series 1200 (Hewlett-Packard, Estados Unidos) de programa isocrático con un flujo constante de 1ml/min y una fase móvil que permite la detección de dopamina y de sus metabolitos: ácido homovanílico (HVA) y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) en aproximadamente 5.5min (ver figura M5).

La fase móvil consiste en una solución 82/12 (Zanassi et al., 1999) de tampón acetato-citrato 0.1M y metanol grado HPLC (Scharlab S.L., España). El tampón acetato-citrato se prepara disolviendo acetato sódico (Merck, Alemania) y ácido cítrico (Merck, Alemania) en agua ultrapura (sistema de purificación Milli-Q Plus®, Merck Millipore, Alemania). A esta solución se añade sulfonato sódico (Scharlab S.L., España) 2.9mM y ácido etilen-diamino-tetraacético EDTA (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) 1mM. Se ajusta el pH a 3.48 mediante la adición de HCl 1N (Panreac Química S.A.U., España). Por último se filtra el tampón (filtros GSWP4700, poro 0.22µm, Merck Millipore, Alemania). Antes de su utilización la fase móvil se introduce en un baño de sonicación durante 15min favoreciendo así su desgasificación. La fase móvil se mantiene recirculando en el sistema de HPLC durante aproximadamente un mes.

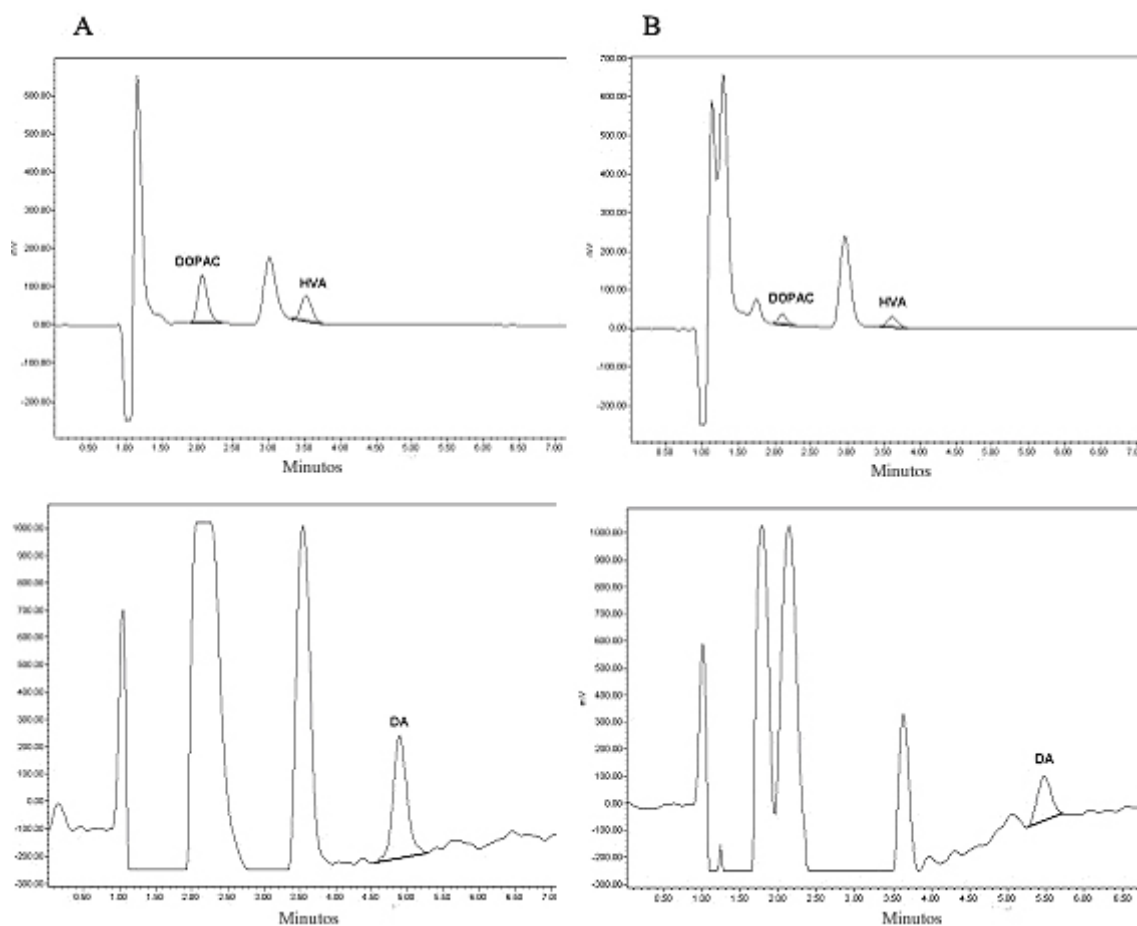


Figura M5. Ejemplo de cromatogramas obtenidos según las condiciones cromatográficas descritas en el texto. A) Muestra patrón de concentración conocida (1nM para dopamina y 100nM para DOPAC y HVA). B) Ejemplo de muestra obtenida en un experimento de microdiálisis. Superior, célula 1 o de oxidación; inferior, célula 2 o de reducción. Abreviatura DA: dopamina.

2.8.1.2. Calibración:

La calibración se lleva a cabo con el fin de insertar en el programa informático los valores de referencia del tiempo de retención, así como el factor de respuesta correspondiente a la dopamina y sus metabolitos. El tiempo de retención de una sustancia es el tiempo necesario para que dichas sustancias recorran completamente la columna de separación del cromatógrafo. El factor de respuesta de una sustancia pone en relación las concentraciones conocidas de esa sustancia con las áreas de los picos cromatográficos. Para llevar a cabo la calibración del cromatógrafo se inyectan diferentes concentraciones de dopamina (0.5, 1, 2, 4, 10, 25 y 50nM) y sus metabolitos (12, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000nM). El límite de detección es de 0.15nM para la dopamina, 0.5nM para el DOPAC (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) y 10nM para el HVA (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).

2.8.1.3. Cálculo del coeficiente de variación:

Para calcular la variación intrínseca propia del método de análisis se inyectan en el cromatógrafo 6 alícuotas de una solución patrón 1nM de dopamina, 140nM de DOPAC y 70nM de HVA. Puesto que estas inyecciones son realizadas por el mismo experimentador y en las mismas condiciones, las posibles diferencias obtenidas han de ser debidas a la variabilidad propia del método. Los coeficientes de variación (CV) obtenidos se expresan en la siguiente tabla (Tabla M1):

Tabla M1. Coeficientes de variación de dopamina, DOPAC y HVA empleando el método descrito; n, tamaño de muestra; S, desviación estándar; CV, coeficiente de variación; DA, dopamina.

	n	Media (nM)	S	CV (%)
DA	6	0.98	0.11	11.59
DOPAC	6	135.30	2.54	1.88
HVA	6	66.44	4.76	7.17

2.8.1.4. Linealidad del análisis cromatográfico:

Para determinar la linealidad del análisis cromatográfico utilizado se inyectan soluciones patrón con concentraciones variables y conocidas de las catecolaminas a analizar. La representación gráfica de la relación entre el área bajo la curva de cada catecolamina (eje de ordenadas) y la concentración inyectada (eje de abscisas) se ajusta a una línea recta (Figura M6).

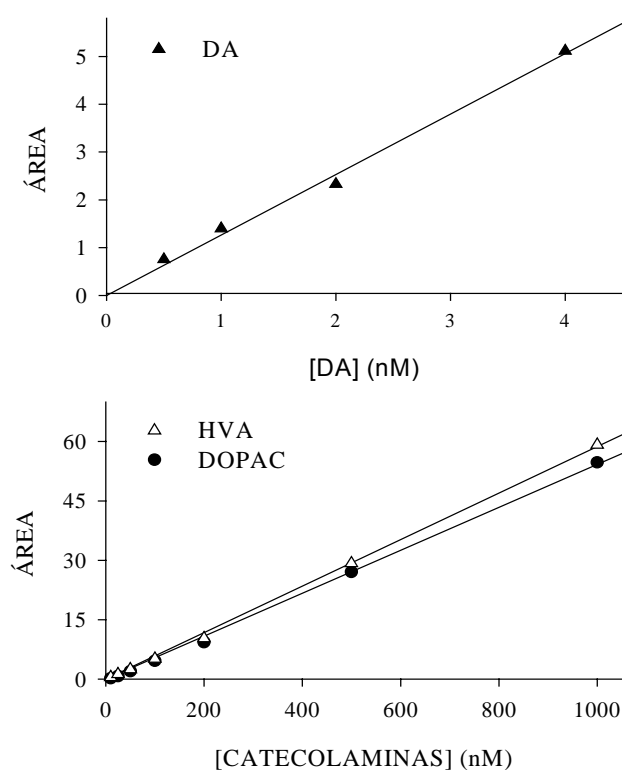


Figura M6. Curva de linealidad obtenida para dopamina, DOPAC y HVA bajo las condiciones descritas.

2.8.2. Detección de aminoácidos:

El análisis de aminoácidos se realiza mediante HPLC acoplada a un detector de fluorescencia (Waters 474, Estados Unidos). Para llevar a cabo la cuantificación de los aminoácidos se realiza una derivatización pre-columna con el reactivo *o*-ftaldehído-3-mercaptopropiónico (OPA-3-mercaptopropiónico) de acuerdo con los métodos descritos previamente en nuestro laboratorio (Segovia et al., 1997; Segovia and Mora, 1998; Segovia et al., 1999).

Para la preparación de OPA-3-mercaptopropiónico se disuelven 32mg de *o*-ftaldehído (OPA) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) en 800µl de metanol grado HPLC (Scharlab S.L., España), a los que se añaden 7140µl de una solución tampón de borato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Panreac Química S.A.U., España) 0.1M ajustada a un pH de 9.5. Posteriormente se añaden 54µl de ácido 3-mercaptopropiónico (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos). La solución debe conservarse a temperatura ambiente en un frasco opaco y cerrado. El reactivo se prepara cada semana.

La derivatización pre-columna se realiza mediante la programación de un inyector automático refrigerado (4°C) (HP 1100 Series, Hewlett-Packard, Estados

Unidos) que lleva a cabo los siguientes pasos: a la muestra de 6µl se le añaden 6µl de estándar interno (homoserina 6.25µM). Posteriormente se añaden 10µl del reactivo OPA-3-mercaptopropiónico. Al cabo de un minuto se añaden 5µl de ácido acético al 5% con el fin de reducir el pH de la reacción y detenerla. Finalizada la derivatización, se realiza la inyección de la muestra, que pasa por una columna Waters Spherisorb® ODS-2 (Waters, Irlanda), con un tamaño de partícula de 5µm, un diámetro de 4.6mm y una longitud de 150mm.

La detección de los aminoácidos OPA-derivatizados se lleva a cabo mediante un detector de fluorescencia Waters 474 con un filtro de excitación de 340nm y un filtro de emisión de 460nm. El cálculo del tiempo de retención y la cuantificación de los aminoácidos se realiza mediante el programa informático Millennium 32® (Waters, Estados Unidos) siguiendo el método del estándar interno. Mediante este método se añade a todas las muestras una concentración conocida de una molécula que constituirá el estándar interno. La concentración de cada uno de los aminoácidos se obtiene mediante el cociente entre el área del pico correspondiente al aminoácido estudiado dividido por el área del estándar interno para cada una de las muestras. El estándar interno empleado fue homoserina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).

2.8.2.1. Condiciones cromatográficas:

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

La fase móvil A consiste en una solución 95/5 (Zanassi et al., 1999) de tampón acetato sódico 50mM y metanol grado HPLC (Scharlab S.L., España), a la cual se le añaden 12.5ml de alcohol isopropílico grado HPLC (Scharlab S.L., España) por cada litro de mezcla. El tampón acetato sódico se prepara a partir de una solución de acetato sódico 4M (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), ajustada a un pH de 5.67 con NaOH (Panreac Química S.A.U., España) en lentejas y ácido acético glacial (Merck, Alemania) y posteriormente filtrada (filtros GSWP4700, poro 0.22µm, Merck Millipore, Alemania).

La fase móvil B es una solución 70/30 (Zanassi et al., 1999) de metanol grado HPLC (Scharlab S.L., España) y agua ultrapura (sistema de purificación Milli-Q Plus®, Merck Millipore, Alemania) previamente filtrada (filtros GSWP4700, poro 0.22µm, Merck Millipore, Alemania).

Previamente a su utilización ambas soluciones se introducen en un baño de sonicación durante 15min para su desgasificación. Durante el proceso de análisis, la desgasificación se realiza mediante un flujo de helio de 10ml/min.

Se establece un programa de gradiente de paso de ambas soluciones, presentado en la tabla M2. Los primeros 16min de este programa son el tiempo de análisis de la muestra, y los 4min siguientes permiten recuperar las condiciones de inyección.

Tabla M2. Programa de gradientes para el análisis de aminoácidos.

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

El tiempo de retención para el glutamato (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) es aproximadamente de 4.5min, y para el ácido γ -aminobutírico (GABA, Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) de 15min bajo las condiciones descritas (figura M7).

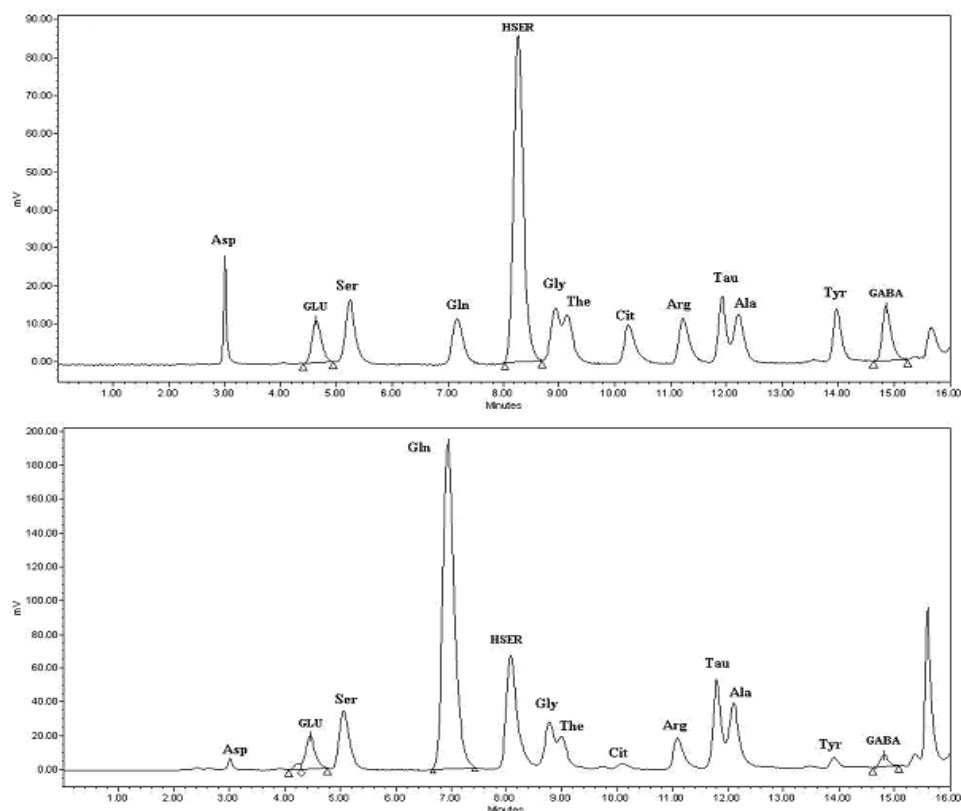


Figura M7. Ejemplo de cromatogramas obtenidos bajo las condiciones cromatográficas descritas en el texto. Arriba: patrón (1 μ M para cada uno de los aminoácidos). Abajo: muestra de microdiálisis. Abreviaturas: Asp: aspartato; GLU: glutamato; Ser: serina; HSER: homoserina; Gly: glicina; The: treonina; Cit: citrulina; Arg: arginina; Tau: taurina; Ala: alanina; Tyr: tirosina; GABA: ácido γ -aminobutírico.

2.8.2.2. Calibración:

La calibración se realiza con el fin de proporcionar al programa informático los valores de referencia de los tiempos de retención, así como la recta de calibración de cada aminoácido analizado. Para ello, se preparan soluciones patrón con cada uno de los aminoácidos analizados a partir de las soluciones madre. La calibración se realiza inyectando en el cromatógrafo 5 patrones de concentraciones diferentes (0.25, 0.5, 1, 5, 10 y 20 μ M). El límite de detección es de 0.5 μ M.

2.8.2.3. Cálculo del coeficiente de variación (CV):

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

Los coeficientes de variación (CV) obtenidos para el glutamato y el GABA se expresan en la tabla M3.

Tabla M3. Coeficientes de variación obtenidos para glutamato y GABA según el método descrito; n, tamaño de muestra; S, desviación estándar; CV, coeficiente de variación; Glu: glutamato.

	n	Media (μM)	S	CV (%)
Glu	6	1.256	0.075	5.272
GABA	6	1.119	0.108	9.018

2.8.2.4. Linealidad del análisis cromatográfico:

Para determinar la linealidad del método de análisis cromatográfico empleado se inyectan en el cromatógrafo soluciones patrón con concentraciones variables de los aminoácidos a analizar. La representación gráfica de la relación entre el área bajo la curva de los aminoácidos (eje de ordenadas) y la concentración inyectada (eje de abscisas) se ajusta a una línea recta (figura M8).

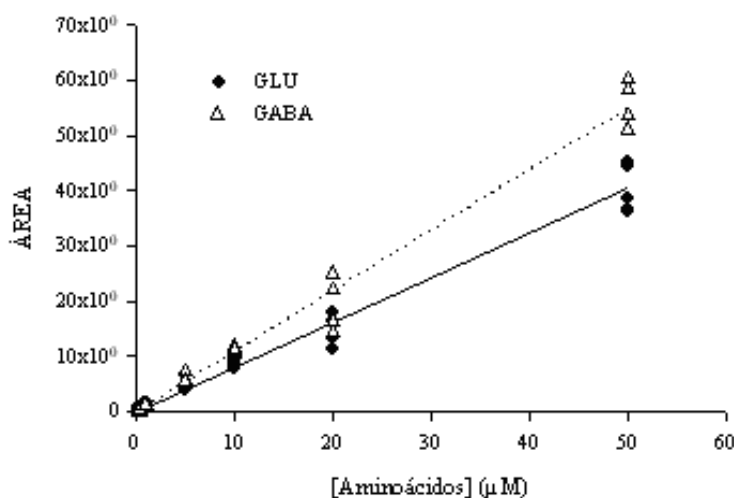


Figura M8. Curva de linealidad obtenida para los aminoácidos glutamato y GABA bajo las condiciones descritas.

2.9. Verificación de la localización de la cánula de microdiálisis:

Tras finalizar los experimentos de microdiálisis se sacrifica a los animales mediante una sobredosis de Equithesin. A continuación, tras la perfusión intracardiaca mediante solución salina (NaCl 0.9%), seguida de formol 25%, se extraen los cerebros, manteniéndolos en formol hasta su posterior disección. Se realizan cortes de $50\mu\text{m}$ de espesor mediante un criostato (Leica CM 1510S, Alemania). Las secciones se observan

mediante una lupa de aumento (Zeiss Stemi 2000, Alemania). La posición aproximada de las cánulas se representa en la figura M9.

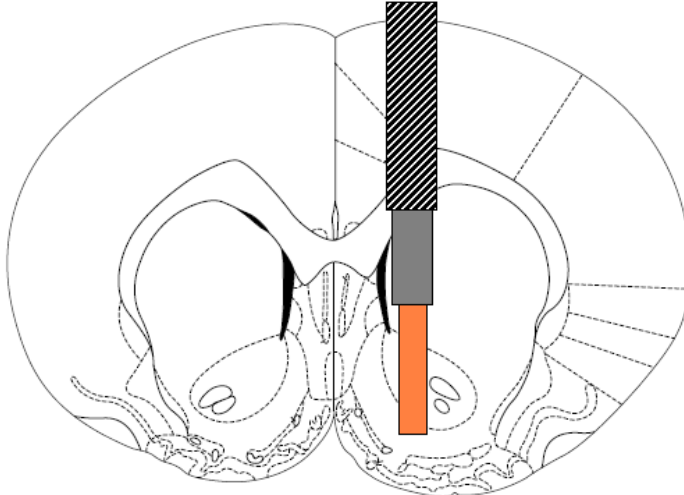


Figura M9. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata. En naranja se representa la localización aproximada de la membrana de la cánula de microdiálisis (núcleo accumbens). La fracción rayada corresponde a la cánula guía, y en gris oscuro se representa la porción metálica de la cánula de microdiálisis que penetra en el tejido. Modificado de Paxinos y Watson, 1998.

3. Cuantificación de la expresión de ARNms específicos:

3.1. Extracción del tejido:

Los animales son sacrificados mediante decapitación y el cerebro rápidamente extraído y congelado mediante hielo seco e isopentano (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos). Los cerebros se almacenan a -80°C hasta su disección.

Se realizan cortes de $300\mu\text{m}$ de los cerebros mediante un criostato (Leica CM 1510S, Alemania) y se extraen las áreas de estudio (núcleo accumbens y estriado dorsal en este caso) diseccionándolas sobre una placa Petri en hielo. Las muestras se almacenan en tubos eppendorf (1.5ml) a -80°C .

3.2 Extracción del ARN:

La extracción del ARN de las muestras se lleva a cabo mediante el siguiente protocolo. Las muestras son homogeneizadas en $500\mu\text{l}$ de TRI Reagent™ (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) mediante varios pases suaves a través de una jeringuilla de

un calibre de 25ga. Para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteicos, se mantienen las muestras a temperatura ambiente durante 5min. Posteriormente se añade 0,1 ml de Cloroformo sin aditivos (Merck, Alemania) por cada 500µl de TRI utilizado y se agita en vortex vigorosamente durante 15 segundos y se mantienen durante 5min a temperatura ambiente. Se centrifuga la mezcla a 12000 x g durante 15min a 4° C. Tras la centrifugación, la mezcla se separa en tres fases: una fase inferior orgánica (proteínas), una interfase (ADN) y una fase superior, acuosa e incolora (ARN).

Se separa la fase acuosa (ARN) en un nuevo tubo y se añaden 250µl de isopropanol (Scharlab S.L., España) por cada 500µl de TRI utilizado. Se agita por inversión y se mantienen las muestras durante 7min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugan a 12000 x g durante 10min a 4°C, de manera que el ARN precipita y forma un pellet en el fondo del tubo.

A continuación, se elimina el sobrenadante por decantación, y se procede al lavado del pellet con 500µl de etanol 75% (preparado a partir de etanol absoluto, Panreac Química S.A.U., España, y agua ultrapura, sistema de purificación Milli-Q Plus®, Merck Millipore, Alemania) por cada 500µl de TRI utilizado. Se agita en vortex la muestra y posteriormente se centrifuga a 12000 x g durante 10min a 4°C.

Finalmente, se retira de nuevo el sobrenadante por decantación y se deja secar el pellet durante unos minutos. Se añaden 20µl de agua DEPC (dietil-pirocarbonato) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) y se introducen las muestras en un termobloque a 55-60°C durante 15min para favorecer la disolución del sedimento de ARN.

Las muestras se almacenan a -80°C hasta su posterior análisis.

3.3. Cuantificación del ARN:

Para comprobar la calidad y la integridad del ARN extraído y llevar a cabo su cuantificación se emplea un sistema de electroforesis automatizado Experion™ (BioRad, Estados Unidos). Este sistema permite realizar electroforesis de muestras en un chip (Experion™ StdSens). El chip contiene un conjunto de pocillos y microcanales conectados entre sí. El chip ha de ser cebado con una matriz de polímero que contiene un fluoróforo que se unirá específicamente a las bases del ARN que contienen las muestras. Cada muestra se calienta a 70°C para desnaturalizarla y favorecer su unión al fluoróforo. En cada pocillo de análisis se añaden 5µl de tampón (composición no facilitada por la casa comercial) y 1µl de muestra. Para compensar las pequeñas variaciones en pH o concentración de sal, se usa un marcador interno (presente en el

tampón añadido) que normaliza los tiempos de migración entre muestras, lo que asegura que el programa informático de análisis identifique apropiadamente los picos. En otro de los pocillos se añade una muestra “escalera” que contiene 8 fragmentos de ARN de diferentes tamaños (desde 200 hasta 6000 nucleótidos) (ver Figura M10).

De forma resumida, el sistema trabaja como sigue: una vez introducido el chip en el sistema el movimiento de la muestra es controlado por electrodos que están en contacto con la solución en los pocillos. Se aplica un voltaje a los pocillos de muestra de forma secuencial (uno a uno) provocando que los fragmentos de ARN cargados migren en el canal de separación. En este canal de separación la matriz de polímero que actúa como un tamiz da lugar a que los fragmentos de ARN se muevan a diferente velocidad dependiendo de su tamaño, lo que permite separarlos. Pero, además, durante la migración se intercala un fluoróforo de forma específica entre las bases de ARN. A medida que los fragmentos migran hacia el final del canal de separación, una célula láser excita al fluoróforo, que emite fluorescencia cuando está unido a los fragmentos de ARN. La fluorescencia es detectada mediante un fotodiodo y el programa informático del sistema representa la intensidad de fluorescencia frente al tiempo para producir un electroferograma (ver Figura M11).

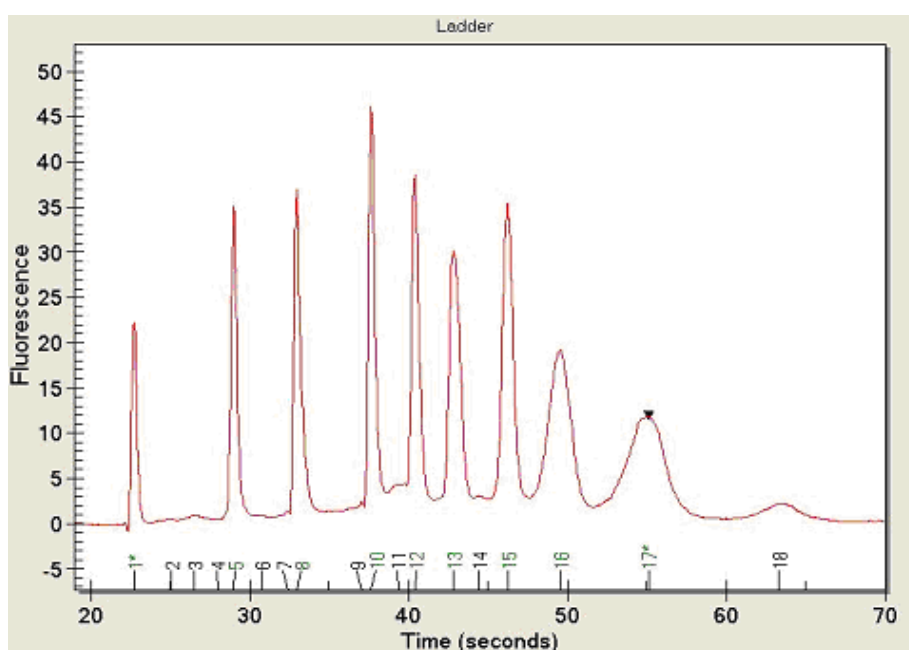


Figura M10. Electroferograma de ARN “escalera”. El primer pico corresponde a un fragmento de 50pb (marcador interno) presente en todas las muestras con el fin de alinearlas. El resto de picos corresponden a fragmentos de ARN de diversa longitud (200-6000 nucleótidos).

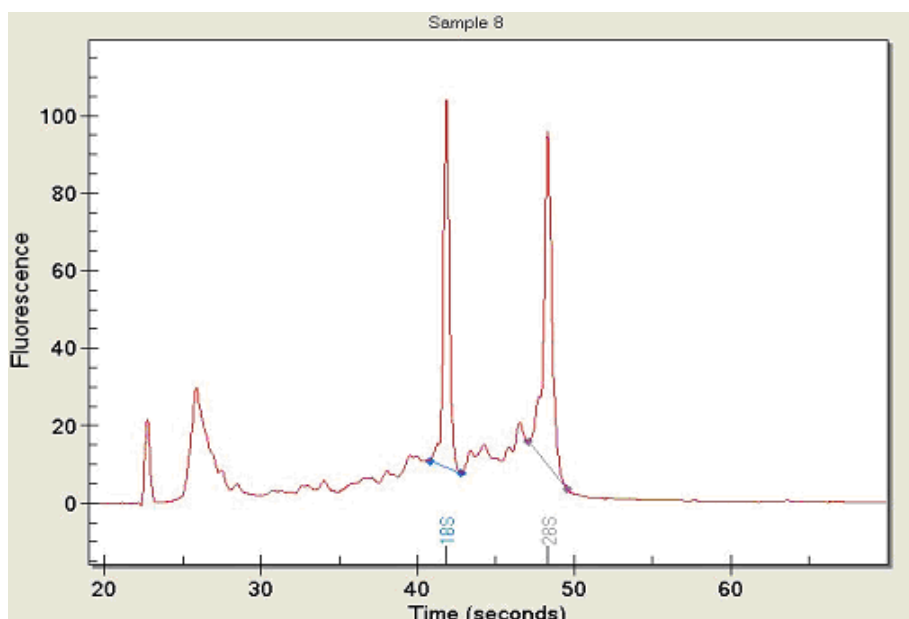


Figura M11. Electroferograma de una muestra de tejido. El software cuantifica automáticamente el área de los picos correspondientes a los fragmentos de ARNr 18S y 28S. El primer pico que se observa corresponde a un fragmento de 50pb (marcador interno) que sirve para alinear todas las muestras analizadas.

Para cuantificar la concentración de ARN total de las muestras, el software del sistema emplea el cociente del área del ARN de la muestra frente al área total del ARN “escalera”. El programa informático del sistema proporciona el indicador de calidad del ARN (RQI), que permite estimar el nivel de degradación de una muestra de ARN total eucariota. Este algoritmo mide la integridad del ARN comparando el electroferograma de las muestras con una serie de muestras de ARN degradadas estandarizadas. El RQI es un valor entre 1 (ARN muy degradado) y 10 (ARN intacto). En el presente trabajo, el valor a partir del cual aceptamos que el ARN estaba en buenas condiciones fue de 8. Por último, el software presenta una representación virtual de una electroforesis creada a partir de los datos obtenidos en los distintos electroferogramas (Figura M12).

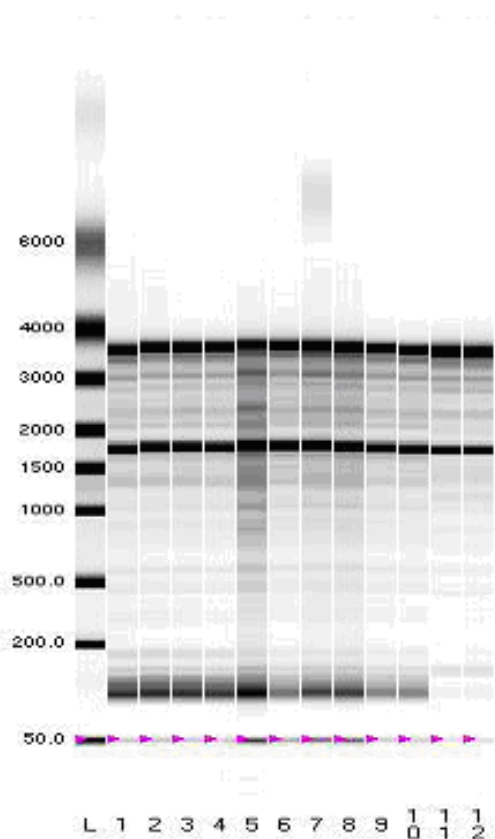


Figura M12. Electroforesis virtual generada a partir de los electroferogramas obtenidos para diversas muestras. La primera columna corresponde a la muestra de ARN “escalera”.

3.4. Síntesis de ADNc:

A partir de $1\mu\text{g}$ del ARN extraído (y cuantificado por el Experion), se obtiene ADN complementario (ADNc) mediante el método de la retrotranscripción. Para ello se emplean unas polimerasas denominadas retrotranscriptasas, presentes en algunos virus que tienen ARN como material genético en lugar de ADN. La enzima empleada en este trabajo es la MLV-RT (retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney) (Promega, Estados Unidos).

Se prepara la mezcla de reacción que consiste en los siguientes componentes (kit comercial Promega, Estados Unidos) ($15\mu\text{l}$ finales para cada muestra):

-transcriptasa inversa (MLV-RT)	1.0 μl
-tampón 5x	4.0 μl
-MgCl ₂	4.0 μl
-PCR nucleotide mix (dNTPS)	1.0 μl
-RNAsin	0.5 μl
-H ₂ O DEPC	4.5 μl

El *PCR nucleotide mix (dNTPs)* es la mezcla de nucleótidos que permite la síntesis del ADNc. El *RNAsin* es un inhibidor de las RNAsas que impide la degradación del ARN.

Se añade en un eppendorf nuevo la cantidad de muestra necesaria para tener 1µg de ARN, y se completa con agua DEPC hasta 4µl. Posteriormente se añade 1µl de *random primers* (Promega, Estados Unidos), que son secuencias aleatorias de nucleótidos que se unen a las hebras sencillas de ARN y permiten que la transcriptasa inversa comience a sintetizar el ADNc.

Se calienta la muestra con los *random primers* a 70°C durante 5min para facilitar su acoplamiento. Inmediatamente después se mantienen las muestras en hielo durante otros 5min como mínimo.

Se añaden 15µl de la mezcla de reacción a cada una de las muestras, mantenidas siempre en hielo, y se calientan a 25°C durante 5min. Pasado este tiempo las muestras se incuban a 42°C durante 1h.

Transcurrido el tiempo de incubación se inactiva la enzima calentando las muestras a 70°C durante 15min, y a continuación se diluyen añadiendo agua DEPC hasta un volumen final de 150µl. Las muestras se pueden almacenar a -80°C.

3.5. Amplificación del ADNc:

La amplificación del ADNc tiene lugar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1986; Mullis, 1990). Este método permite amplificar secuencias de ADN de forma selectiva. Está basado en la síntesis de una hebra complementaria de ADN a partir de una cadena simple utilizada como molde. La PCR emplea dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis, que se unen de forma específica a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del ADN. El proceso básico de la PCR se desarrolla en tres fases que se repiten un número determinado de veces en función del gen que se desea amplificar:

- desnaturalización: consiste en la separación de las cadenas complementarias de ADN.
- unión o *annealing*: consiste en la unión de los oligonucleótidos específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de oligonucleótidos.
- extensión: durante esta fase tiene lugar la síntesis de la hebra complementaria a partir del respectivo oligonucleótido.

La repetición de este ciclo un número determinado de veces da lugar a un incremento exponencial del fragmento diana del ADN, que viene dado por la

expresión 2^n (siendo n el número de ciclos), hasta que se alcanza un punto en el que disminuye la eficacia de la enzima y la reacción deja de ser exponencial.

La RT-PCR, o PCR a tiempo real, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, gracias al uso de sustancias con propiedades fluorescentes que únicamente emiten fluorescencia cuando el ADN se encuentra en forma de doble hebra (Kubista et al., 2006).

El valor que se obtiene mediante la RT-PCR no es la fluorescencia, sino el número de ciclos necesarios para que la amplificación sea exponencial, el denominado ciclo umbral (Ct). Cuanto mayor sea la cantidad de ADNc de partida, menor será el valor de Ct, ya que harán falta menos ciclos para que la amplificación sea exponencial.

Este método se denomina también PCR semi-cuantitativa, ya que permite conocer la expresión relativa de un gen concreto con respecto a la expresión de otro gen constitutivo que no varía con las diferentes condiciones experimentales del estudio.

En nuestro caso, la sustancia fluorescente utilizada fue el Sybr®Green (Applied Biosystems™, Life Technologies Corporation, Estados Unidos), y el gen constitutivo utilizado fue el ARNr 18S (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos). El *Sybr®Green PCR Master Mix* contiene el tampón de reacción, la mezcla de nucleótidos y la polimerasa necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación, así como el fluoróforo que permite la detección del producto de la reacción.

Para llevar a cabo la amplificación se utilizan placas de 96 pocillos (Sorenson™, Bioscience Inc., Estados Unidos), y cubiertas adhesivas ópticas para dichas placas (Applied Biosystems™, Life Technologies Corporation, Estados Unidos).

Para la amplificación se utiliza una mezcla de reacción que debe tener una concentración final de 5mM de los oligonucleótidos que se van a utilizar como cebadores (Tabla M4). Así mismo, un 50% de la mezcla debe ser Sybr®Green, y el otro 50% debe ser una mezcla de los oligonucleótidos y agua DEPC. En cada pocillo se cargan 2µl de muestra y 8µl de la mezcla de reacción, que contiene:

-Sybr®Green	4.5µl
-Oligonucleótidos	0.5µl
-Agua DEPC	4.0µl

Si el gen a estudiar se expresa abundantemente, como es el caso del ARN ribosómico 18S que se utiliza como referente, es necesario hacer diluciones de las muestras (1/100).

Una vez cargada la placa, se cubre con la cubierta adhesiva óptica, que se adhiere a la superficie con ayuda de un sellador para evitar que las muestras se evaporen durante el proceso. Se centrifuga brevemente para favorecer que la muestra se encuentre en el fondo del pocillo y se introduce la placa en el termociclador cuantitativo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems™, Life Technologies Corporation, Estados Unidos).

El termociclador lleva a cabo una serie de cambios de temperatura programados para favorecer la reacción de amplificación, según las siguientes temperaturas y tiempos:

- paso 1 (se repite una vez): 50°C, 2min

- paso 2 (se repite una vez): 95°C, 10min

- paso 3 (se repite 40 veces): 95°C, 15s
 60°C, 1min

- paso 4 (se repite una vez): 95°C, 15s
 60°C, 30s
 95°C, 15s

Transcurrido este proceso, se obtiene una tabla con las Cts de cada muestra.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en el presente trabajo (tabla M4) fueron amablemente cedidos por el Dr. Ángel Santos y la Dra. Elena Giné.

Tabla M4. Secuencia de los cebadores utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia (5' -3')
18S	Sentido CCAGTAAGTGC GGGTCATAAGC
	Antisentido CCTCACTAAACCATCCAATCGG
NR1.0	Sentido TCAGTTCATGTGGTGGCTGT
	Antisentido GAATCGGCCAAAGGGACT
NR2A	Sentido AAGGGTTCGAGGAAAGCAGAA
	Antisentido GGTCTCGAGGAGTAATGGCAC
NR2B	Sentido AGGCCCTCTTCATGACCACC
	Antisentido TTAATGGGACCTGGAATGGC
NR2C	Sentido ACAGGCGTGACCGGTACAC
	Antisentido GCTTTCACTCGATCCAACCC
NR2D	Sentido GAGCACTGCTGCGTCATAGATG
	Antisentido CAGCTCAAGGCAGGGAAACT
NR3A	Sentido AGTGAGGCAGGGAGCTCTCTT
	Antisentido CCCACCAGGACATCCCTCT
GluR1	Sentido GCCAGCTCCACACAGTAGCC
	Antisentido CAACCAGTTTGAGGGCAATGA
GluR2	Sentido GCCCCCGACAAGGATGTAG
	Antisentido GCCCTCAGTCTGAGCAACGT
GluR3	Sentido CGTCATGTGTCAGCGCAGAT
	Antisentido CTGAAGCCAAGAATGCACCA
GluR4	Sentido GAAGAACCACCACACGCCTC
	Antisentido TCACCCAGATCCCTGTCAGG
GR	Sentido CACCCATGATCCTGTCAGTG
	Antisentido AAAGCCTCCCTCTGCTAACC
MR	Sentido TAAGTTTCCCCACGTGGTTC
	Antisentido ATCCACGTCTCATGGCTTTC

La expresión matemática que permite la cuantificación de la expresión de genes mediante este método es la siguiente:

$$2^{-\Delta C_t}$$

Siendo $\Delta C_{tx} = C_{t_{\text{gen de estudio}}} - C_{t_{\text{gen de referencia de la muestra x}}}$.

$$\Delta C_{ty} = C_{t_{\text{gen de estudio}}} - C_{t_{\text{gen de referencia de la muestra y}}}$$

Para que el empleo de esta fórmula matemática sea válido, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen de estudio sea similar a la del gen de referencia. Esta comprobación se llevó a cabo mediante el análisis de un conjunto de muestras diluidas (por ejemplo 1/10, 1/100, 1/1000) para comprobar que la curva estándar fuera lineal con una pendiente cercana a 3.4 y una $r=0.99$, condiciones en las que la eficiencia de la amplificación está cercana al 100%. Esto supone que durante la fase exponencial de la reacción, el aumento de un ciclo de amplificación daría lugar exactamente a la duplicación del material amplificado.

Para facilitar la representación de los datos se puede considerar como valor de referencia 1 a uno de los grupos experimentales (por ejemplo, grupo control). Para ello se suma o resta una cantidad a la expresión ΔCt de cada una de las muestras de modo que el promedio de la expresión $2^{-\Delta Ct}$ del grupo experimental correspondiente fuese igual a 1. A continuación, se suma o resta esa misma cantidad a los ΔCt de las muestras del otro grupo experimental (por ejemplo, animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental) y se calcula el promedio, que se compara con el valor de referencia 1 del otro grupo.

4. Evaluación de la actividad motora espontánea:

La actividad motora espontánea de los animales se evalúa en dispositivos de campo abierto (MED Associates Inc., Estados Unidos). Estos dispositivos consisten en cajas de Plexiglas de 80 x 80 x 30cm con dos hileras de ocho células fotoeléctricas cada una, colocadas a 5 y 15cm de altura, y que permiten registrar tanto la actividad motora horizontal como vertical (fig. M13). Los animales son colocados en el centro del campo abierto en una única sesión y sin haber sido habituados a él previamente, y se les permite explorarlo libremente durante 60min. Las interrupciones de los haces de las células fotoeléctricas son registradas mediante un programa informático (MED Associates Inc., Estados Unidos). El campo abierto se limpia con alcohol 70% antes de colocar a cada animal para evitar el olor del animal previo.



Fig. M13. Fotografía de los aparatos de campo abierto utilizados.

5. Análisis estadístico:

Para realizar el análisis de los datos obtenidos mediante los experimentos de microdiálisis correspondientes a los diferentes neurotransmisores se realizan análisis de la varianza (ANOVA) factoriales de 3 vías con medidas repetidas, siendo los factores Grupo (niveles: control y enriquecimiento ambiental), Tratamiento (niveles: 0, 50 y 600ng/ml de corticosterona para el bloque 1; niveles: 0 y 600ng/ml de corticosterona para los bloques 2 y 3) y Tiempo (niveles: cada una de las muestras obtenidas durante el experimento de microdiálisis, 20min cada una), seguidos de comparaciones planeadas (análisis *a priori*). Con el fin de comparar los efectos producidos por la perfusión de las diferentes drogas sobre los neurotransmisores estudiados, los datos se analizan como el promedio de los incrementos absolutos con respecto a los niveles basales (promedio del periodo basal, 60min). Los datos correspondientes a actividad motora se analizan de la misma manera, pero tomando como basales los datos correspondientes al periodo basal y a los 60min previos (total 120min).

El análisis del efecto de las condiciones ambientales sobre la expresión de receptores se realiza mediante un ANOVA de dos vías, siendo los factores Grupo (niveles: control y enriquecimiento ambiental) y Edad (niveles: 6, 15 y 27 meses de edad), comparando los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, seguido de comparaciones planeadas (análisis *a priori*).

La actividad motora se evalúa mediante un ANOVA de tres vías con medidas repetidas, siendo los factores Grupo (niveles: control y enriquecimiento ambiental),

Edad (niveles: 6 y 27 meses de edad) y Tiempo (niveles: fracciones de 5min durante 1h).

Los análisis estadísticos se realizan mediante el software Statistica 9.0.

RESULTADOS

1. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la coperfusión de agonistas glutamatérgicos y de corticosterona en el núcleo accumbens de la rata despierta en animales de 6 meses de edad:

1.1. Efecto de la perfusión de NMDA (500 μ M):

1.1.1. Efecto sobre la concentración extracelular de dopamina:

El ANOVA de tres vías (Grupo x Tratamiento x Tiempo) mostró que la perfusión de NMDA modificó la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens (factor Tiempo $F_{8,344}=17,79078$; $p<0,000001$) y que la perfusión de corticosterona modificó el efecto del NMDA sobre la dopamina (factor Tratamiento $F_{2,43}=5,73404$; $p=0,006202$; Tratamiento x Tiempo $F_{16,344}=3,03621$; $p=0,000086$). El factor Grupo no tuvo un efecto significativo sobre la concentración de dopamina ($F_{1,43}=0,62462$; n.s.).

El análisis *a priori* (comparaciones planeadas) mostró que, en los animales mantenidos en condiciones control, la perfusión local de NMDA produjo un aumento en la concentración extracelular de dopamina, que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,43}=1,706297$; n.s.) (Fig. R1, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento en la concentración extracelular de dopamina ($F_{1,43}=21,55313$; $p=0,000032$) (Fig. R1, central). La perfusión de NMDA y corticosterona (600ng/ml) no modificó la concentración de dopamina ($F_{1,43}=0,045555$; n.s.) (Fig. R1, inferior). La perfusión de corticosterona (50ng/ml) produjo un mayor aumento de dopamina que la perfusión de NMDA ($F_{1,43}=8,238809$; $p=0,006337$) y que la perfusión de NMDA y corticosterona (600ng/ml) ($F_{1,43}=9,808456$; $p=0,003122$) (Fig. R2, superior).

En los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental, la perfusión local de NMDA produjo un aumento en la concentración extracelular de dopamina ($F_{1,43}=11,11898$; $p=0,001767$) (Fig. R1, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento de dopamina ($F_{1,43}=26,49736$; $p=0,000006$) (Fig. R1, central). La perfusión de NMDA y corticosterona (600ng/ml) no produjo cambios significativos en la concentración de dopamina ($F_{1,43}=1,782097$; n.s.) (Fig. R1, inferior). Al igual que en los animales control, la perfusión de corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento de dopamina mayor que la perfusión de NMDA y NMDA con corticosterona (600ng/ml) pero, en

este caso, este efecto no alcanzó la significación estadística ($F_{1,43}=1,643566$; n.s. y $F_{1,43}=1,227754$; n.s., respectivamente) (Fig. R2, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la concentración de dopamina (NMDA $F_{1,43}=1,647107$; n.s.; NMDA+CORT50 $F_{1,43}=0,670220$; n.s.; NMDA+CORT600 $F_{1,43}=0,934618$; n.s.).

1.1.2. Efecto sobre la concentración extracelular de GABA:

El ANOVA de tres vías (Grupo x Tratamiento x Tiempo) mostró que la perfusión de NMDA produjo un aumento en la concentración extracelular de GABA en el núcleo accumbens (factor Tiempo $F_{8,352}=15,68817$; $p<0,000001$). Ni el factor tratamiento ni el factor grupo tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de GABA (factor Tratamiento $F_{2,44}=0,82180$; n.s.; factor Grupo $F_{1,44}=0,60451$; n.s.).

El análisis *a priori* (comparaciones planeadas) mostró que, en los animales control, la perfusión local de NMDA no produjo cambios significativos en la concentración extracelular de GABA ($F_{1,44}=1,824136$; n.s.) (Fig. R3, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento en la concentración de GABA ($F_{1,44}=5,833968$; $p=0,019941$) (Fig. R3, central). La perfusión de NMDA y corticosterona (600ng/ml) no modificó significativamente la concentración de GABA ($F_{1,44}=0,011284$; n.s.) (Fig. R3, inferior). No se encontraron diferencias significativas en el efecto sobre la concentración de GABA entre los diferentes tratamientos estudiados (NMDA vs. NMDA+CORT50 $F_{1,44}=1,300822$; n.s.; NMDA vs. NMDA+CORT600 $F_{1,44}=0,513989$; n.s.; NMDA+CORT50 vs. NMDA+CORT600 $F_{1,44}=2,666049$; n.s.) (Fig. R4, superior), aunque se observa una tendencia a que el efecto de NMDA+CORT50 sea mayor.

En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la perfusión de NMDA no produjo cambios significativos en la concentración extracelular de GABA ($F_{1,44}=3,268102$; n.s.) (Fig. R3, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento en la concentración de GABA ($F_{1,44}=5,065725$; $p=0,029451$) (Fig. R3, central). La perfusión de NMDA y corticosterona (600ng/ml) produjo un aumento en la concentración de GABA ($F_{1,44}=5,437785$; $p=0,024347$) (Fig. R3, inferior). No se observaron diferencias significativas en el efecto sobre la concentración extracelular de GABA entre los tratamientos estudiados (NMDA vs. NMDA+CORT50 $F_{1,44}=0,141019$; n.s.; NMDA vs.

NMDA+CORT600 $F_{1,44}=1,244552$; n.s.; NMDA+CORT50 *vs.* NMDA+CORT600 $F_{1,44}=0,696657$; n.s.) (Fig. R4, inferior).

No se observaron diferencias entre los grupos de enriquecimiento ambiental y control cuando se compararon los efectos de los diferentes tratamientos (NMDA $F_{1,44}=0,075427$; n.s.; NMDA+CORT50 $F_{1,44}=0,366982$; n.s.; NMDA+CORT600 $F_{1,44}=3,024477$; n.s.).

1.1.3. Efecto sobre la actividad motora:

El ANOVA de tres vías (Grupo x Tratamiento x Tiempo) mostró que la perfusión de NMDA modifica la actividad motora de los animales (factor Tiempo $F_{8,348}=15,40148$; $p<0,000001$). No se observaron diferencias entre los grupos experimentales (factor Grupo $F_{1,48}=0,00291$; n.s.), ni entre los distintos tratamientos (factor Tratamiento $F_{2,48}=0,01561$; n.s.), en el efecto sobre la actividad motora. El tratamiento con diferentes dosis de corticosterona modificó la actividad motora producida por la perfusión de NMDA, dependiendo de las condiciones en las que se mantuvieron los animales (Grupo x Tratamiento x Tiempo $F_{16,384}=2,43647$; $p=0,001617$).

El análisis *a priori* (comparaciones planeadas) mostró que, en los animales control, la perfusión local de NMDA produjo un aumento en la actividad motora de los animales ($F_{1,48}=11,67921$; $p=0,001297$) (Fig. R5, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento en la actividad motora que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,48}=3,457570$; n.s.) (Fig. R5, central). La perfusión de NMDA y corticosterona (600ng/ml) no produjo cambios significativos en la actividad motora de los animales ($F_{1,48}=0,076652$; n.s.) (Fig. R5, inferior). No se observaron diferencias significativas en el efecto sobre la actividad motora entre los diferentes tratamientos estudiados (NMDA *vs.* NMDA+CORT50 $F_{1,48}=0,644368$; n.s.; NMDA *vs.* NMDA+CORT600 $F_{1,48}=3,267357$; n.s.; NMDA+CORT50 *vs.* NMDA+CORT600 $F_{1,48}=1,016088$; n.s.) (Fig. R6, superior).

En los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental, la perfusión de NMDA produjo un aumento en la actividad motora que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,48}=2,250067$; n.s.) (Fig. R5, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento en la actividad motora ($F_{1,48}=9,671124$; $p=0,003146$) (Fig. R5, central). La perfusión de NMDA y

corticosterona (600ng/ml) produjo un aumento en la actividad motora de los animales ($F_{1,48}=5,325169$; $p=0,025375$) (Fig. R5, inferior). No se observaron diferencias significativas en el efecto sobre la actividad motora de los tratamientos estudiados (NMDA vs. NMDA+CORT50 $F_{1,48}=1,774733$; n.s.; NMDA vs. NMDA+CORT600 $F_{1,48}=1,763646$; n.s.; NMDA+CORT50 vs. NMDA+CORT600 $F_{1,48}=0,137065$; n.s.) (Fig. R6, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó el efecto de los distintos tratamientos sobre la actividad motora (NMDA $F_{1,48}=2,441127$; n.s.; NMDA+CORT50 $F_{1,48}=0,363730$; n.s.; NMDA+CORT600 $F_{1,48}=2,599778$; n.s.).

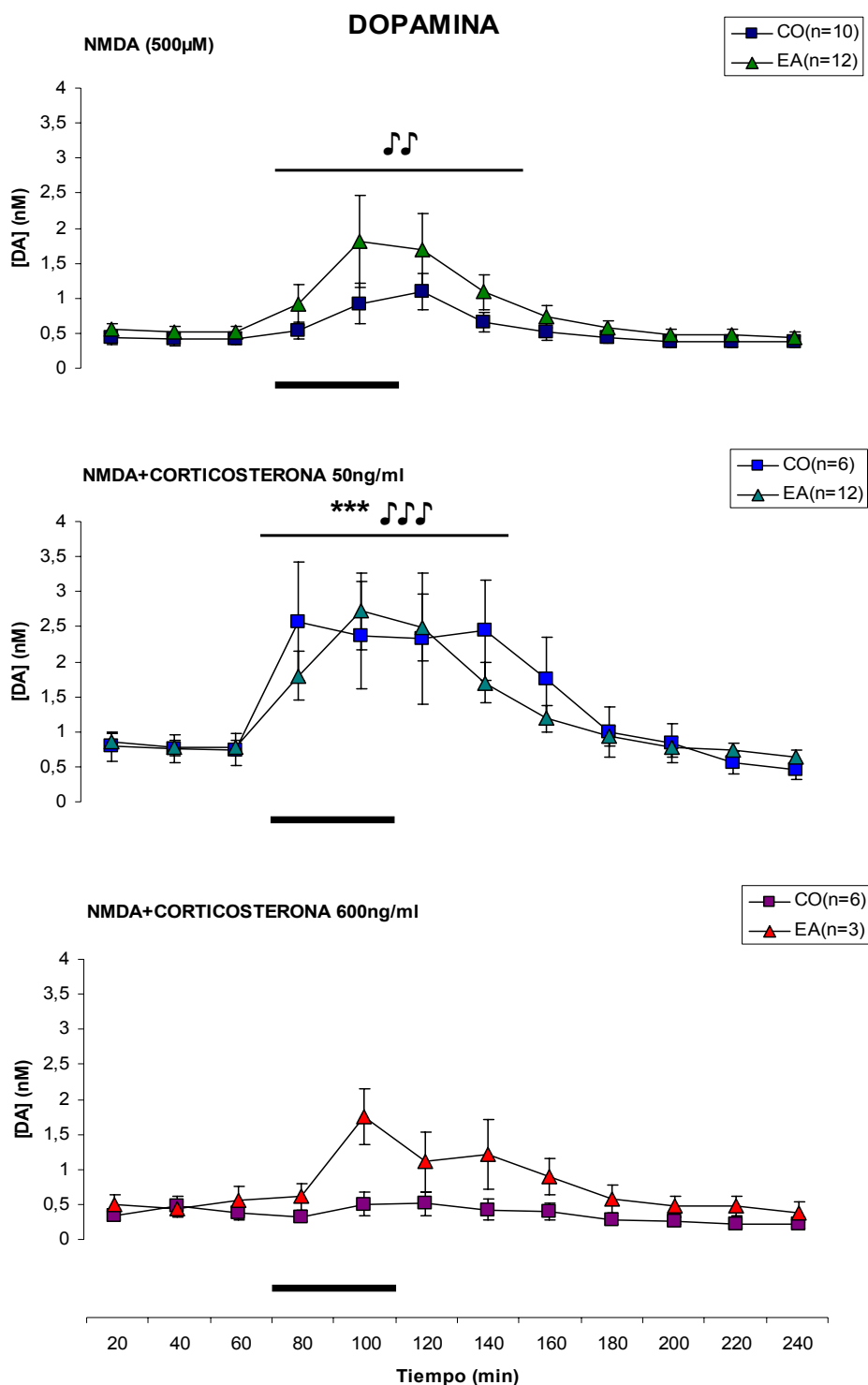


Fig. R1. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel central, efecto de la perfusión de NMDA junto con corticosterona (50ng/ml). Panel inferior, efecto de la perfusión de NMDA junto con corticosterona (600ng/ml). Los datos (media±EEM) se representan como concentraciones absolutas (nM). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO *** $p < 0,001$; EA ♪♪ $p < 0,01$; ♪♪♪ $p < 0,001$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos 20 a 60min).

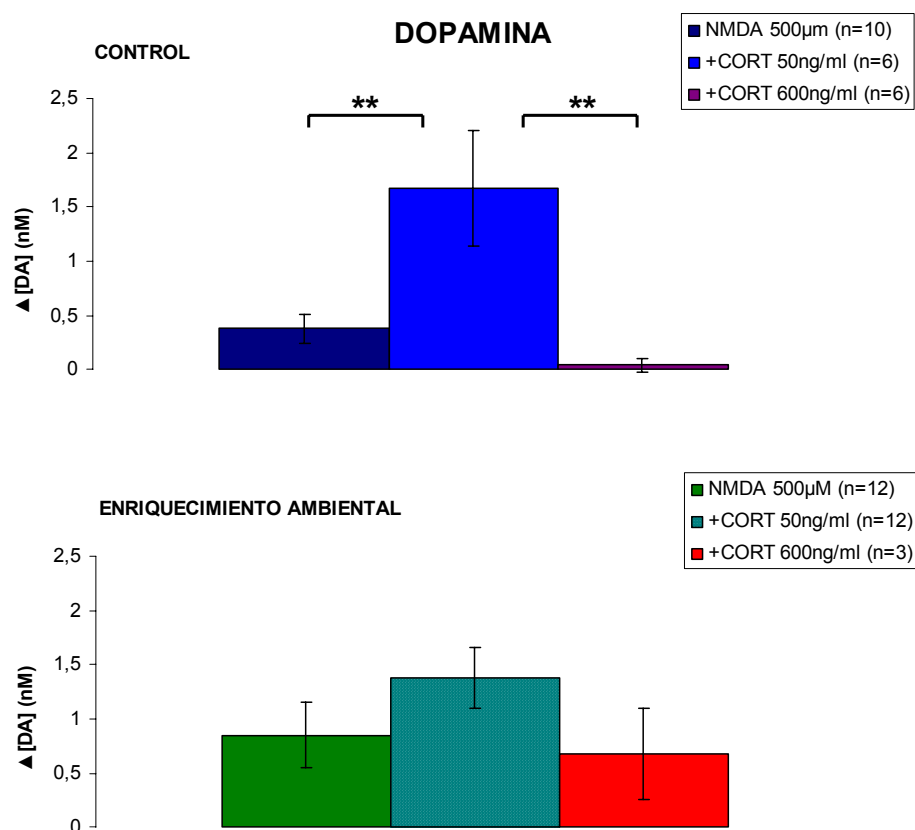


Fig. R2. Incrementos de dopamina con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media±EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 7 (minutos 80 a 140 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos 20 a 60 en el perfil temporal). CO (grupo control)

** $p < 0,01$

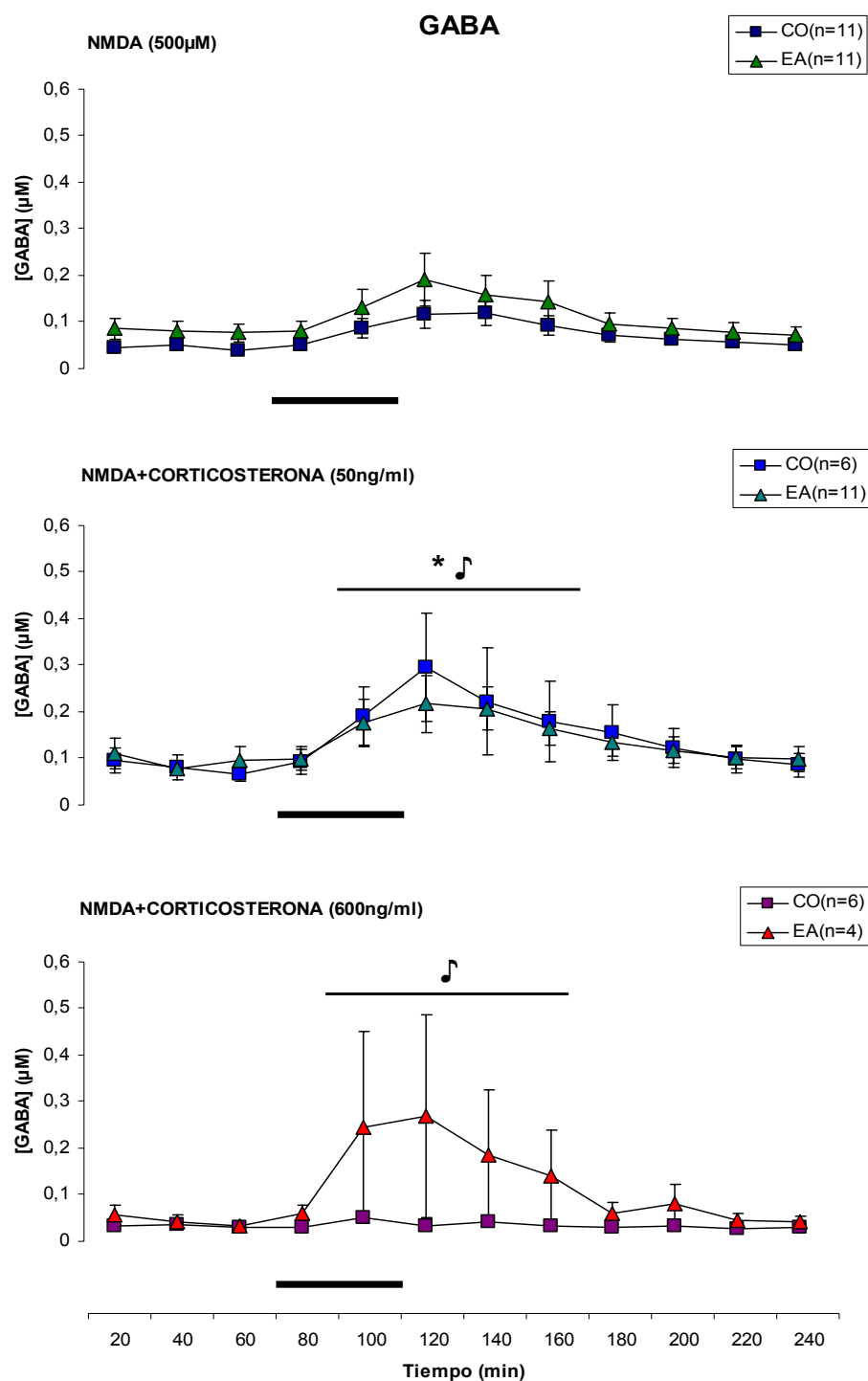


Fig. R3. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la concentración extracelular de GABA en el núcleo accumbens. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel central, efecto de la perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (50ng/ml). Panel inferior, efecto de la perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (600ng/ml). Los datos (media \pm EEM) se representan como concentraciones absolutas (μ M). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO * $p < 0,05$; EA ♪ $p < 0,05$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos 20 a 60min).

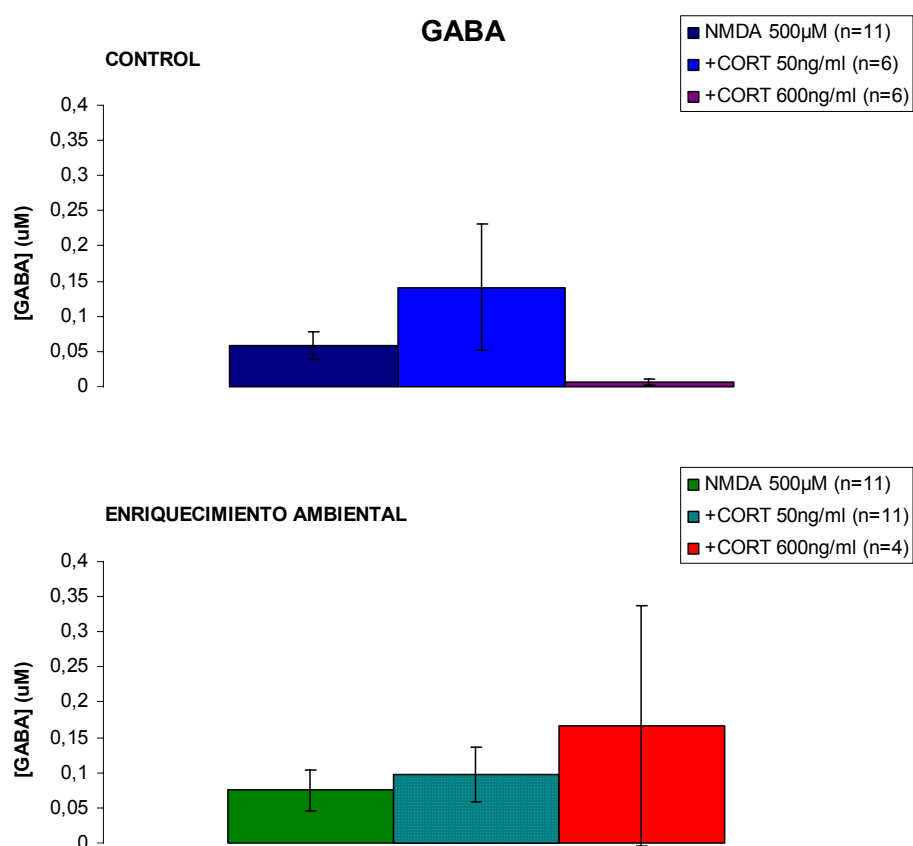


Fig. R4. Incrementos de GABA con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media \pm EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 5 a 8 (minutos 100 a 160 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos 20 a 60 en el perfil temporal).

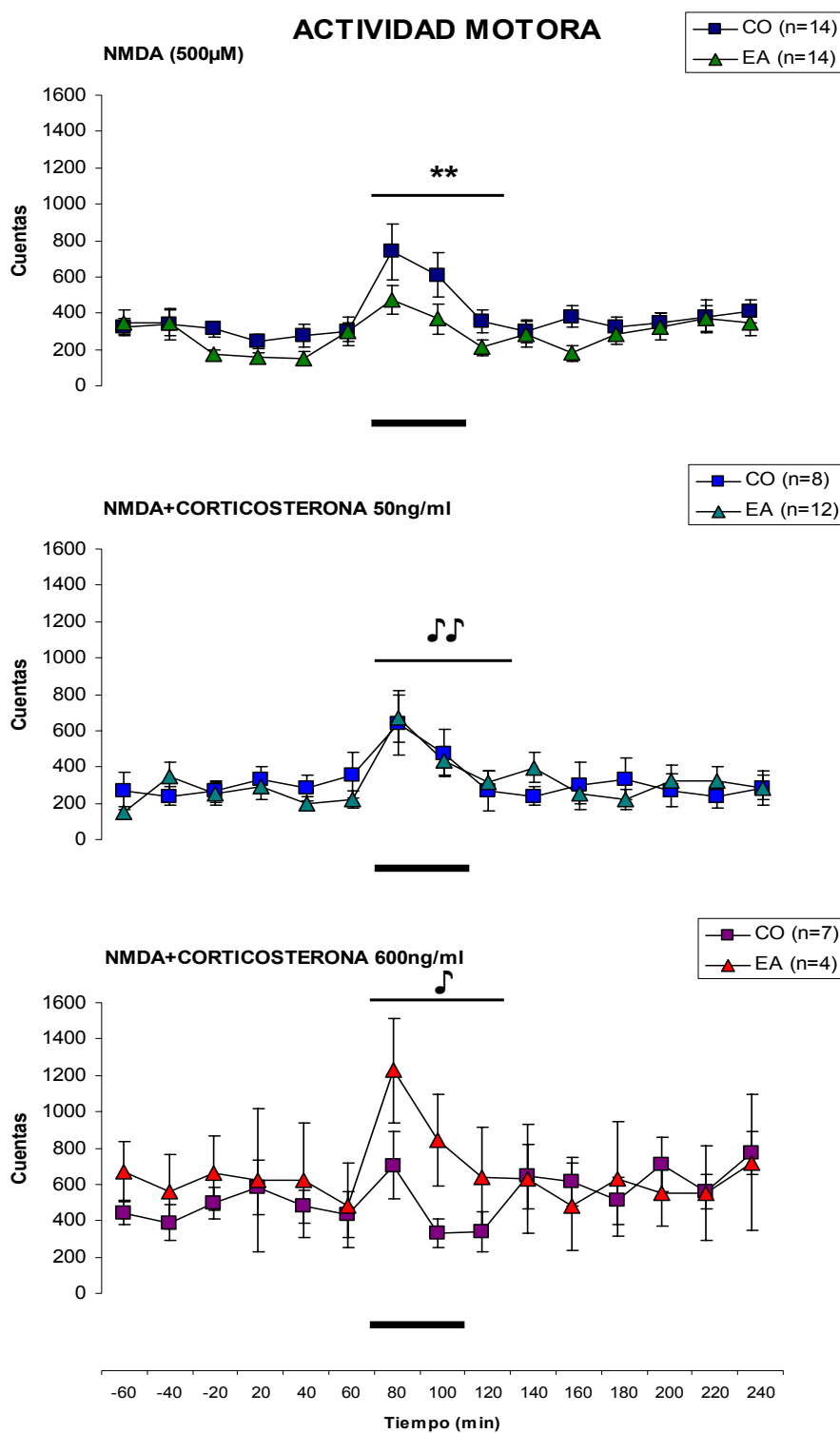


Fig. R5. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la actividad motora. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel central, efecto de la perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (50ng/ml). Panel inferior, efecto de la perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (600ng/ml). Los datos (media±EEM) se muestran como cuentas de actividad (número total de interrupciones de los haces de las células fotoeléctricas). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO *** $p < 0,005$; EA ♪♪ $p < 0,01$; ♪ $p < 0,05$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos -60 a 60min).

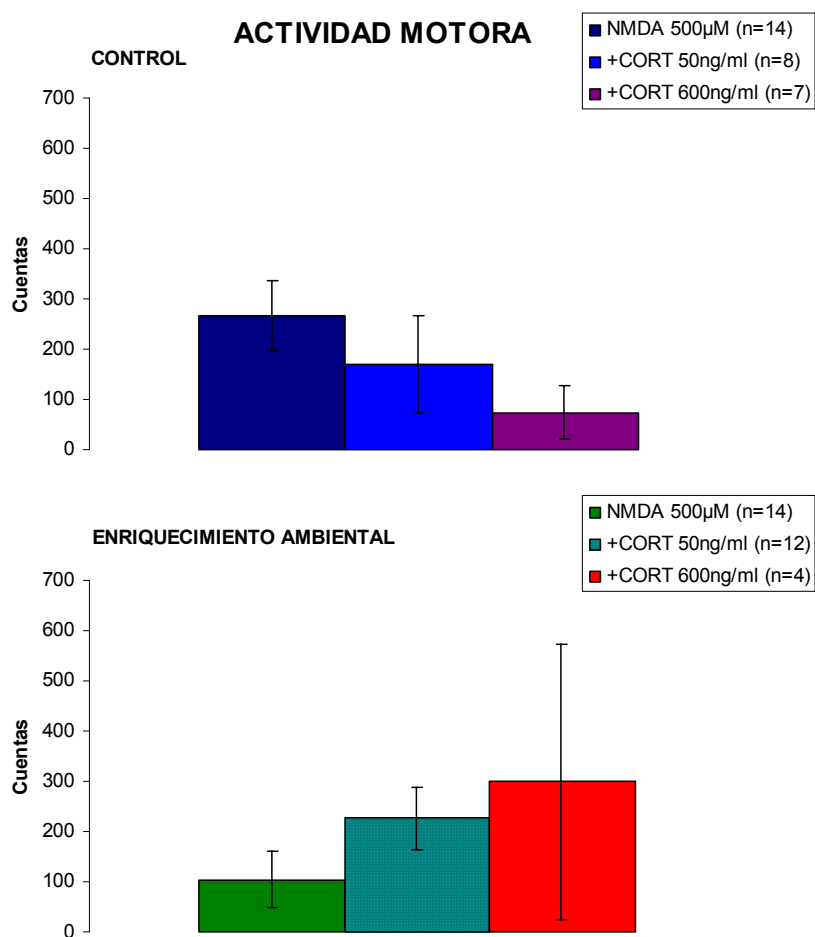


Fig. R6. Incrementos de actividad motora con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media±EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 6 (minutos 80 a 120 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos -60 a 60 en el perfil temporal).

1.2. Efecto de la perfusión de AMPA (100 μ M):

1.2.1. Efecto sobre la concentración extracelular de dopamina:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión local de AMPA produjo un aumento en la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens (factor Tiempo $F_{8,312}=16,24279$; $p<0,000001$). El tratamiento con diferentes dosis de corticosterona y el mantenimiento de los animales en diferentes condiciones experimentales no afectaron a la concentración de dopamina (factor Tratamiento $F_{2,39}=0,77935$; n.s.; factor Grupo $F_{1,39}=1,00099$; n.s.).

El análisis *a priori* (comparaciones planeadas) mostró que, en el grupo de animales control, la perfusión de AMPA produjo un aumento en la concentración de dopamina que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,39}=2,743286$; n.s.) (Fig. R7, superior). La perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (50ng/ml) no produjo cambios en la dopamina ($F_{1,39}=0,048489$; n.s.) (Fig. R7, central). La perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (600ng/ml) tampoco modificó la concentración de dopamina en el núcleo accumbens ($F_{1,39}=2,961498$, n.s.) (Fig. R7, inferior). No se observaron diferencias en el efecto sobre la concentración de dopamina entre los diferentes tratamientos estudiados (AMPA *vs.* AMPA+CORT50 $F_{1,39}=0,769060$; n.s.; AMPA *vs.* AMPA+CORT600 $F_{1,39}=0,131265$; n.s.; AMPA+CORT50 *vs.* AMPA+CORT600 $F_{1,39}=1,223992$; n.s.) (Fig. R8, superior).

En los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental, la perfusión local de AMPA produjo un aumento en la concentración extracelular de dopamina ($F_{1,39}=6,689721$; $p=0,013545$) (Fig. R7, superior). La perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (50ng/ml) también aumentó significativamente la concentración de dopamina ($F_{1,39}=5,834160$; $p=0,020504$) (Fig. R7, central). La perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (600ng/ml) no modificó la concentración de dopamina ($F_{1,39}=0,992195$; n.s.) (Fig. R7, inferior). Las diferencias en el efecto sobre la concentración de dopamina producido por los diversos tratamientos no alcanzaron la significación estadística (AMPA *vs.* AMPA+CORT50 $F_{1,39}=0,030711$; n.s.; AMPA *vs.* AMPA+CORT600 $F_{1,39}=1,053120$; n.s.; AMPA+CORT50 *vs.* AMPA+CORT600 $F_{1,39}=1,237273$; n.s.) (Fig. R8, inferior).

El efecto de los diferentes tratamientos sobre la concentración de dopamina en núcleo accumbens no fue modificado por el enriquecimiento ambiental (AMPA

$F_{1,39}=1,102865$; n.s.; AMPA+CORT50 $F_{1,39}=3,091384$; n.s.; AMPA+CORT600 $F_{1,39}=0,192012$; n.s.).

1.2.2. Efecto sobre la concentración extracelular de GABA:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión de AMPA modificó la concentración de GABA en el núcleo accumbens (factor Tiempo $F_{8,296}=28,06741$; $p<0,000001$). El tratamiento con diferentes dosis de corticosterona también modificó la concentración de GABA (factor Tratamiento $F_{2,37}=3,95745$; $p=0,027702$; Tiempo x Tratamiento $F_{16,296}=4,16839$; $p<0,000001$). Mantener a los animales en diferentes condiciones experimentales no modificó la concentración de GABA ($F_{1,37}=1,16431$; n.s.).

Las comparaciones planeadas (análisis *a priori*) mostraron que, en el grupo control, la perfusión local de AMPA produjo un aumento en la concentración extracelular de GABA en el núcleo accumbens ($F_{1,37}=5,157570$; $p=0,029056$) (Fig. R9, superior). La perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento de GABA que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,37}=0,531428$; n.s.) (Fig. R9, central). La perfusión de AMPA y corticosterona (600ng/ml) produjo un aumento en la concentración de GABA ($F_{1,37}=12,19837$; $p=0,001257$) (Fig. R9, inferior). Los tratamientos con las distintas concentraciones de corticosterona no produjeron efectos diferentes sobre la concentración de GABA (AMPA vs. AMPA+CORT50 $F_{1,37}=0,663243$; n.s.; AMPA vs. AMPA+CORT600 $F_{1,37}=1,491867$; n.s.; AMPA+CORT50 vs. AMPA+CORT600 $F_{1,37}=3,377627$; n.s.) (Fig. R10, superior), aunque se observa una tendencia a que el efecto producido por A+CORT600 sea mayor que el producido por los otros tratamientos.

En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la perfusión de AMPA produjo un aumento de GABA ($F_{1,37}=8,637764$; $p=0,005643$) (Fig. R9, superior). La perfusión de AMPA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento en la concentración de GABA que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,37}=1,271658$; n.s.) (Fig. R9, central). La perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (600ng/ml) produjo un aumento en la concentración extracelular de GABA ($F_{1,37}=19,00644$; $p=0,000100$) (Fig. R9, inferior). El tratamiento con corticosterona 600ng/ml produjo un aumento de GABA mayor que el producido con corticosterona 50ng/ml ($F_{1,37}=4,555242$; $p=0,039510$), pero no mayor que el producido por la perfusión de AMPA ($F_{1,37}=1,009096$; n.s.). No hubo diferencias en el efecto sobre el GABA entre la

perfusión de AMPA y la perfusión de AMPA y corticosterona (50ng/ml) ($F_{1,37}=1,366965$; n.s.) (Fig. R10, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó el efecto de ninguno de los tratamientos sobre la concentración extracelular de GABA en el núcleo accumbens (AMPA $F_{1,37}=0,634925$; n.s.; AMPA+CORT50 $F_{1,37}=0,079476$; n.s.; AMPA+CORT600 $F_{1,37}=0,375864$; n.s.).

1.2.3. Efecto sobre la actividad motora:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión local de AMPA produjo un aumento en la actividad motora de los animales (factor Tiempo $F_{8,352}=6,716808$; $p<0,000001$). Ni el tratamiento con diferentes dosis de corticosterona ni el grupo experimental (control o enriquecimiento ambiental) modificaron la actividad motora de los animales (factor Tratamiento $F_{2,44}=1,007871$; n.s.; factor Grupo $F_{1,44}=1,192228$; n.s.). El tratamiento con diferentes dosis de corticosterona afectó a la actividad motora de manera diferente dependiendo de las condiciones de mantenimiento de los animales (Grupo x Tratamiento x Tiempo $F_{16,352}=1,987639$; $p=0,013278$).

El análisis *a priori* (comparaciones planeadas) mostró que, en los animales control, la perfusión local de AMPA produjo un aumento en la actividad motora de los animales ($F_{1,44}=10,61443$; $p=0,002166$) (Fig. R11, superior). La perfusión de AMPA y corticosterona (50ng/ml) produjo un aumento en la actividad motora que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,44}=2,609310$; n.s.) (Fig. R11, central). La perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (600ng/ml) produjo un aumento en la actividad motora ($F_{1,44}=23,69520$; $p=0,000015$) (Fig. R11, inferior). El tratamiento con corticosterona 600ng/ml produjo un aumento en la actividad motora mayor que el producido por corticosterona 50ng/ml ($F_{1,44}=4,166418$; $p=0,047259$). No hubo diferencias en el efecto sobre la actividad motora entre la perfusión de AMPA y la perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (50ng/ml), ni entre la perfusión de AMPA y la perfusión conjunta de AMPA (100 μ M) y corticosterona (600ng/ml) (Fig. R12, superior).

En los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental, la perfusión de AMPA produjo un aumento en la actividad motora ($F_{1,44}=8,093276$; $p=0,006719$) (Fig. R11, superior). La perfusión conjunta de AMPA y corticosterona

(50ng/ml) y de AMPA y corticosterona (600ng/ml) produjo un aumento en la actividad motora que no alcanzó la significación estadística en ninguno de los dos casos ($F_{1,44}=2,423407$; n.s. y $F_{1,44}=1,660059$; n.s.; respectivamente) (Fig. R11, central e inferior, respectivamente). No se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos en el efecto sobre la actividad motora (AMPA *vs.* AMPA+CORT50 $F_{1,44}=0,829651$; n.s.; AMPA *vs.* AMPA+CORT600 $F_{1,44}=1,211246$; n.s.; AMPA+CORT50 *vs.* AMPA+CORT600 $F_{1,44}=0,035992$; n.s.) (Fig. R12, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó la respuesta de la actividad motora a la perfusión de AMPA ($F_{1,44}=0,036952$; n.s.) ni a la perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (50ng/ml) ($F_{1,44}=0,001115$; n.s.), pero redujo significativamente la respuesta a la perfusión de AMPA y corticosterona (600ng/ml) ($F_{1,44}=4,559985$; $p=0,038332$).

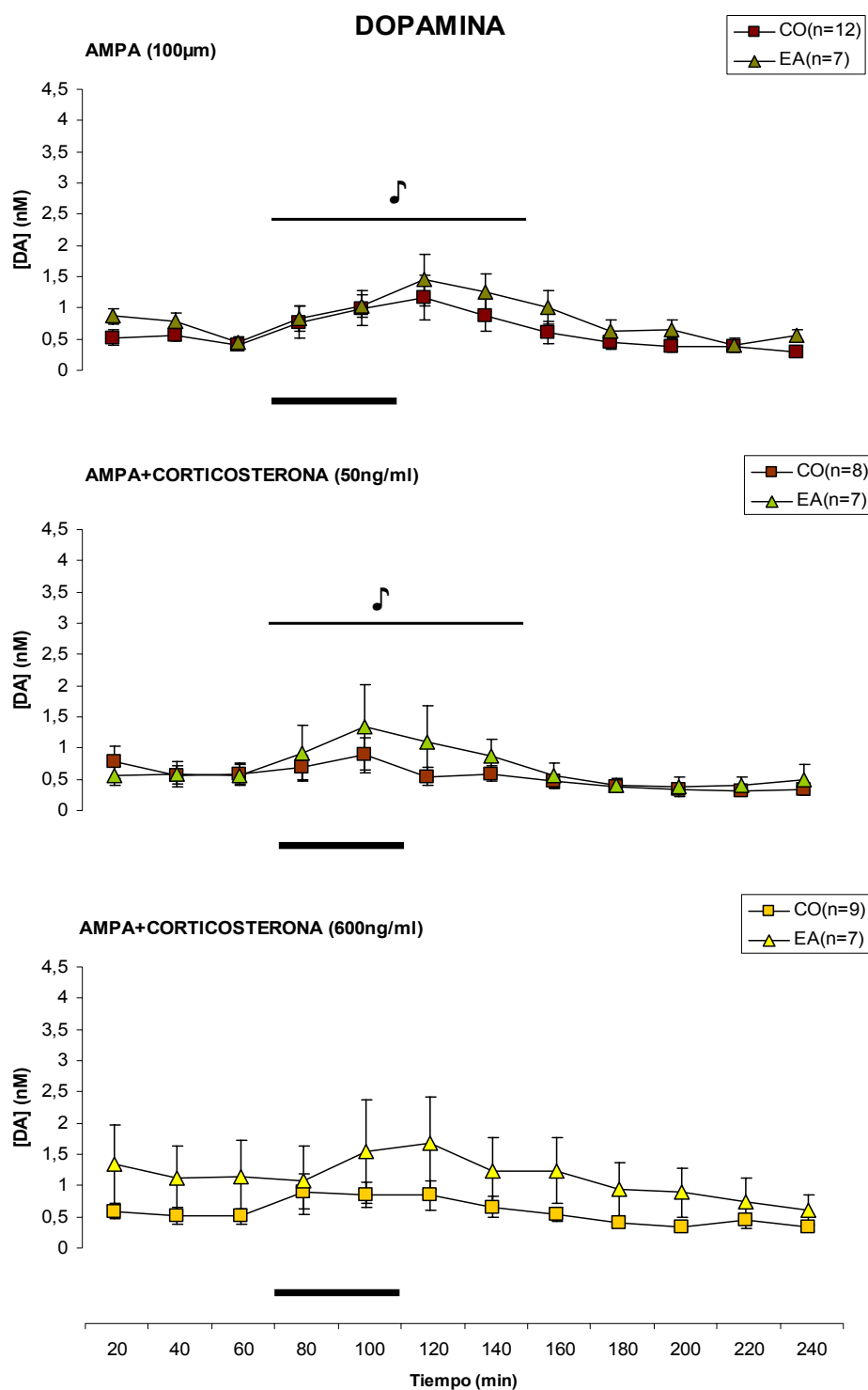


Fig. R7. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens. Panel superior, efecto de la perfusión de AMPA. Panel central, efecto de la perfusión de AMPA junto con corticosterona (50ng/ml). Panel inferior, efecto de la perfusión de AMPA junto con corticosterona (600ng/ml). Los datos (media \pm EEM) se representan como concentraciones absolutas (nM). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. EA ♩ $p < 0,05$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos 20 a 60min).

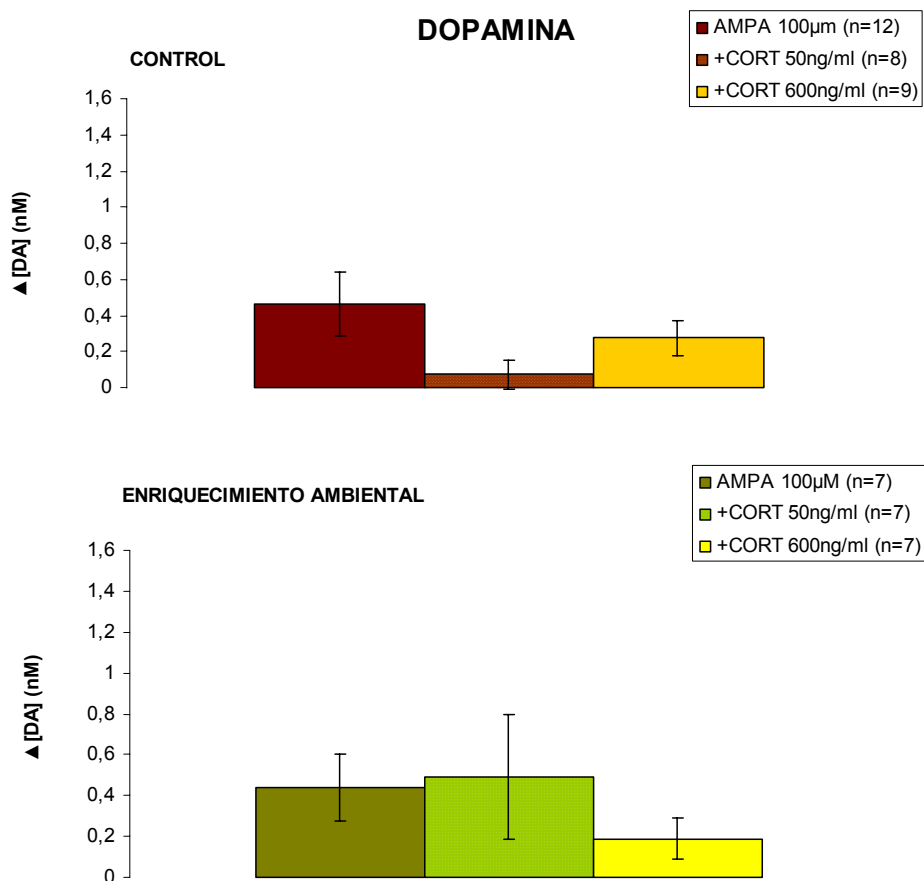


Fig. R8. Incrementos de dopamina con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de AMPA o AMPA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media \pm EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 7 (minutos 80 a 140 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos 20 a 60 en el perfil temporal).

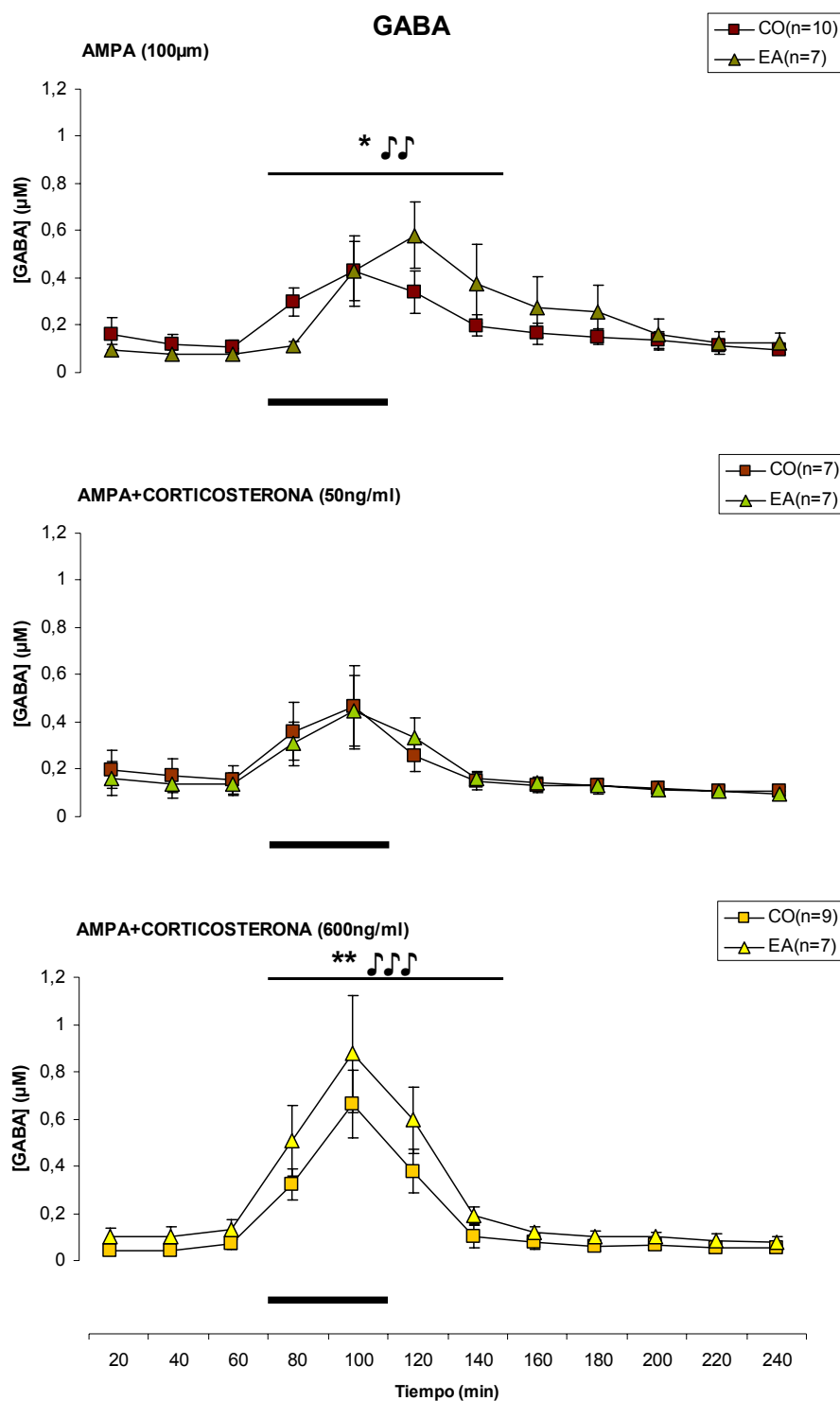


Fig. R9. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la concentración extracelular de GABA en el núcleo accumbens. Panel superior, efecto de la perfusión de AMPA. Panel central, efecto de la perfusión de AMPA junto con corticosterona (50ng/ml). Panel inferior, efecto de la perfusión de AMPA junto con corticosterona (600ng/ml). Los datos (media±EEM) se representan como concentraciones absolutas (µM). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; EA 🎵 $p < 0,01$; 🎵🎵 $p < 0,001$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos 20 a 60min).

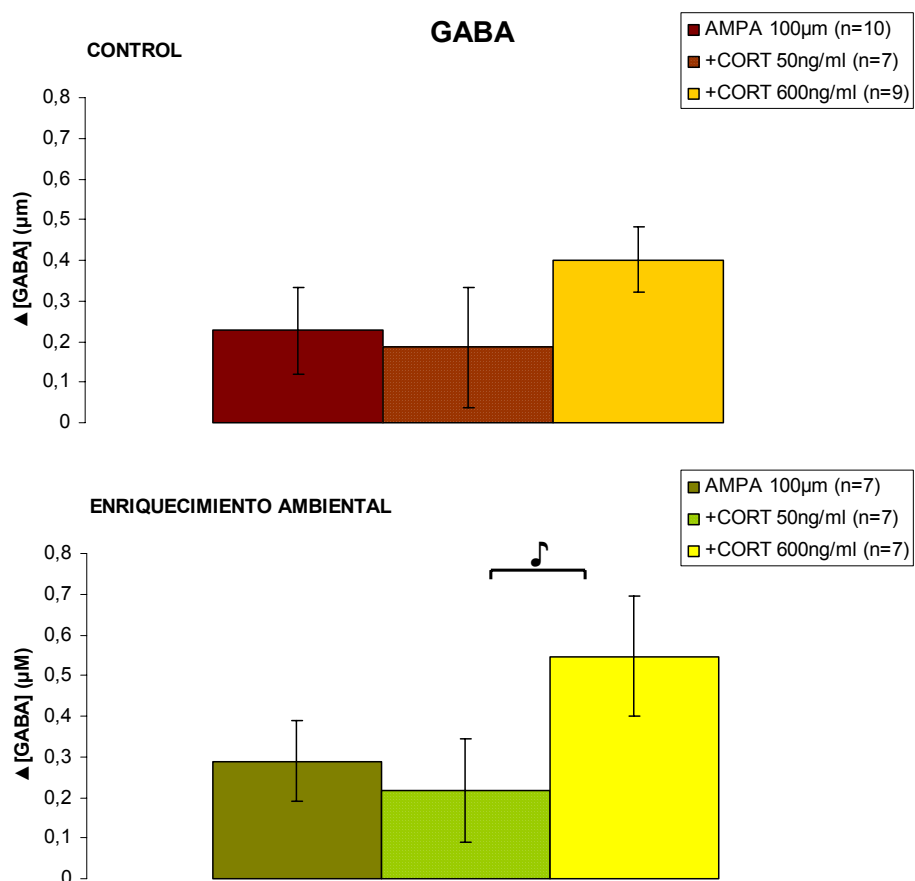


Fig. 10. Incrementos de GABA con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de AMPA o AMPA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media \pm EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 7 (minutos 80 a 140 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos 20 a 60 en el perfil temporal). EA (grupo de enriquecimiento ambiental) ♪ $p < 0,05$

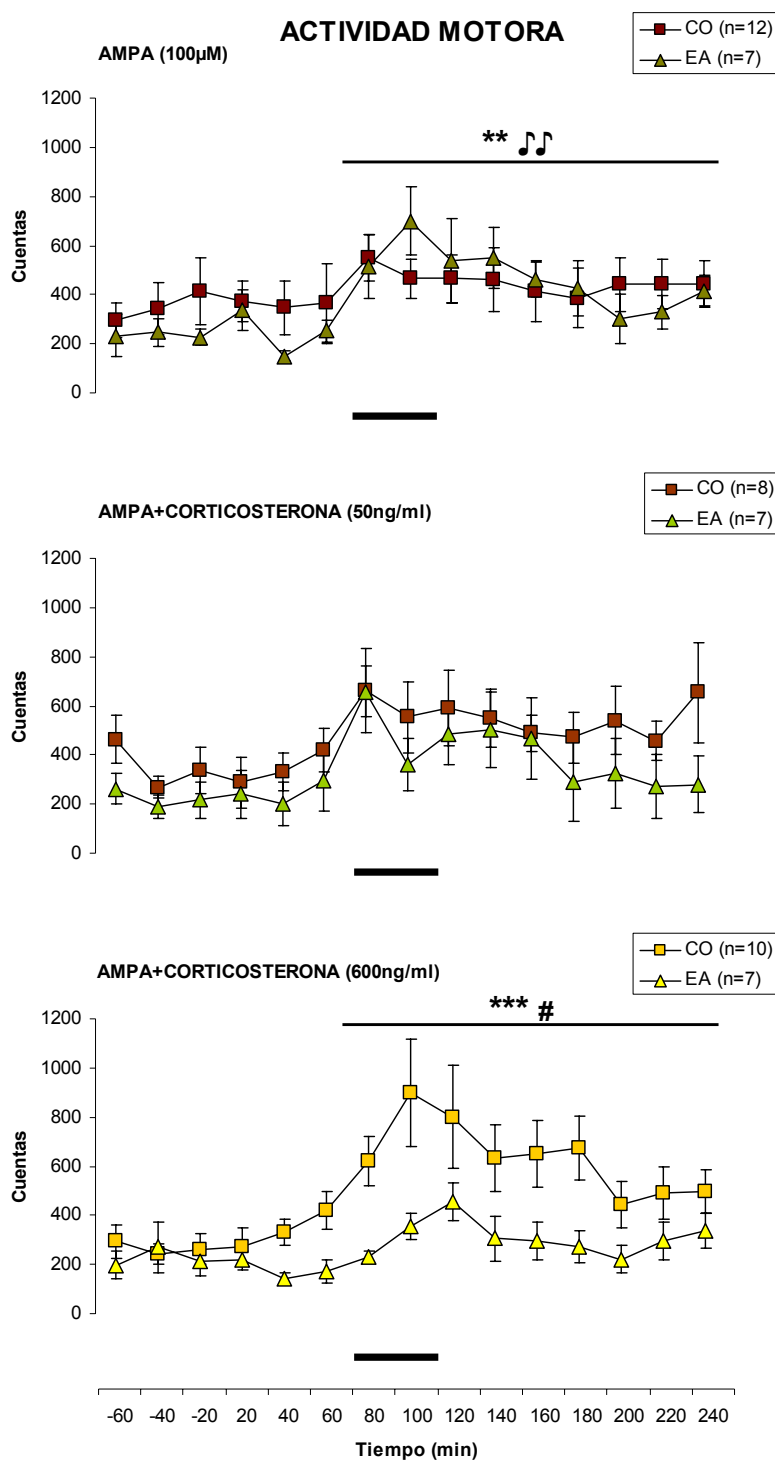


Fig. 11. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la actividad motora. Panel superior, efecto de la perfusión de AMPA. Panel central, efecto de la perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (50ng/ml). Panel inferior, efecto de la perfusión conjunta de AMPA y corticosterona (600ng/ml). Los datos (media±EEM) se muestran como cuentas de actividad (número total de interrupciones de los haces de las células fotoeléctricas). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; EA ♪♪ $p < 0,01$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos -60 a 60min). CO vs. EA # $p < 0,05$

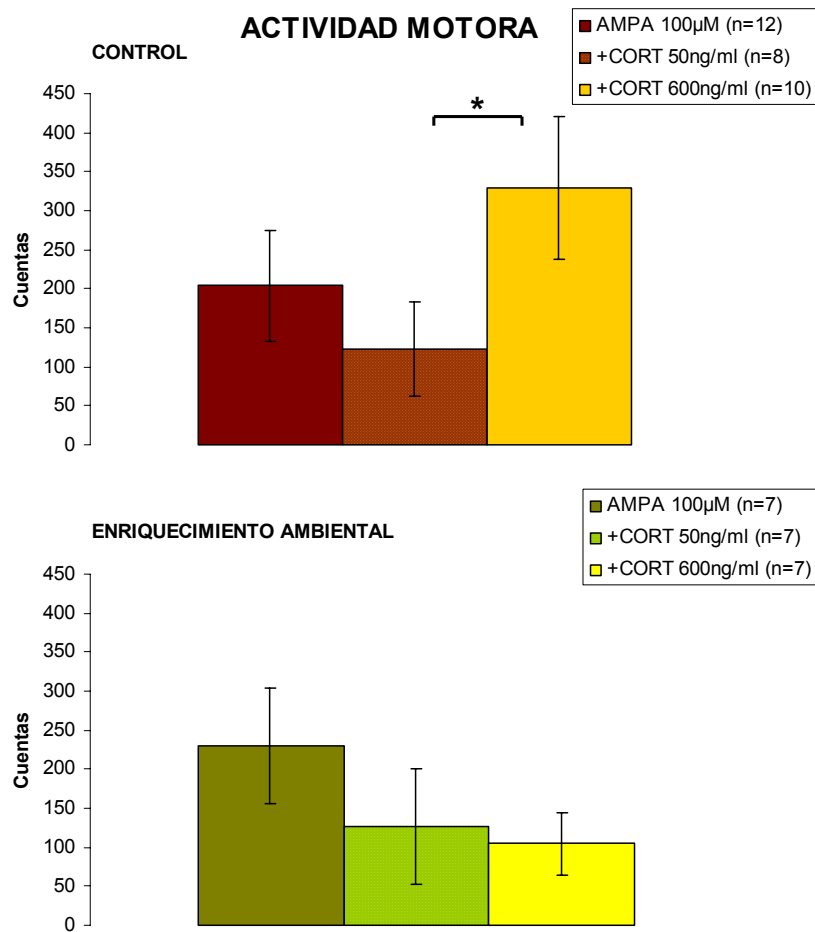


Fig. R12. Incrementos de actividad motora con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de AMPA o AMPA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media±EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 12 (minutos 80 a 240 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos -60 a 60 en el perfil temporal). CO (grupo control) * $p < 0,05$

2. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la coperfusión del agonista glutamatérgico NMDA (500 μ M) y de corticosterona (600ng/ml) en el núcleo accumbens de la rata despierta en animales de 15 meses de edad:

2.1. Efecto sobre la concentración extracelular de dopamina:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión local de NMDA produjo un aumento en la concentración extracelular de dopamina ($F_{8,320}=11,92908$; $p<0,000001$). Ni el tratamiento con corticosterona 600ng/ml ni las condiciones de mantenimiento de los animales modificaron la concentración de dopamina por sí solos (factor Tratamiento $F_{1,40}=0,51769$; n.s.; factor Grupo $F_{1,40}=1,21868$; n.s.), pero se observó que el efecto del tratamiento con corticosterona sobre la concentración de dopamina fue diferente dependiendo de las condiciones de mantenimiento de los animales (Grupo x Tratamiento x Tiempo $F_{8,320}=2,01637$; $p=0,044070$).

Las comparaciones planeadas (análisis *a priori*) mostraron que, en los animales control, la perfusión local de NMDA produjo un aumento de dopamina ($F_{1,40}=7,775384$; $p=0,008068$) (Fig. R13, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona produjo un aumento en la concentración de dopamina ($F_{1,40}=10,31239$; $p=0,002608$) (Fig. R13, inferior). No se observaron diferencias significativas entre el efecto de la perfusión de NMDA y la perfusión de NMDA y corticosterona ($F_{1,40}=0,0469291$; n.s.) (Fig. R14, superior).

En cuanto a los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, se observó que la perfusión de NMDA produjo un aumento en la concentración de dopamina ($F_{1,40}=5,810281$; $p=0,020621$) (Fig. R13, superior), que no alcanzó la significación en el caso de la perfusión de NMDA y corticosterona ($F_{1,40}=1,024869$; n.s.) (Fig. R13, inferior). No se observaron diferencias significativas en el efecto sobre la dopamina entre los tratamientos estudiados ($F_{1,40}=0,769920$; n.s.) (Fig. R14, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó el efecto sobre la concentración de dopamina de la perfusión de NMDA ($F_{1,40}=0,037514$; n.s.) ni de NMDA y corticosterona ($F_{1,40}=2,666566$; n.s.). Sin embargo, se observa una tendencia a que en el grupo de animales mantenidos en enriquecimiento ambiental el efecto de la perfusión conjunta de NMDA y corticosterona sea menor.

2.2. Efecto sobre la concentración extracelular de GABA:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión de NMDA produjo un aumento en la concentración de GABA (factor Tiempo $F_{8,344}=9,700895$; $p<0,000001$). No se observaron efectos del tratamiento con corticosterona 600ng/ml ni del grupo experimental sobre la concentración de GABA (factor Tratamiento $F_{1,43}=0,329362$; n.s.; factor Grupo $F_{1,43}=0,030145$; n.s.).

El análisis *a priori* (comparaciones planeadas) mostró que en los animales control, tanto la perfusión de NMDA como la perfusión de NMDA y corticosterona produjeron un leve aumento en la concentración de GABA, que no alcanzó la significación estadística en ninguno de los casos ($F_{1,40}=1,705707$; n.s.; $F_{1,40}=3,383687$; n.s.; respectivamente) (Fig. R15, superior e inferior, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($F_{1,40}=0,220558$; n.s.) (Fig. 16, superior).

En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la perfusión de NMDA produjo un aumento de GABA ($F_{1,40}=8,896955$; $p=0,004692$) (Fig. R15, superior). La perfusión de NMDA y corticosterona no produjo modificaciones en la concentración extracelular de GABA ($F_{1,40}=0,829396$; n.s.) (Fig. R15, inferior). No se observaron diferencias significativas entre el efecto de ambos tratamientos sobre la concentración de GABA ($F_{1,40}=1,973913$; n.s.) (Fig. 16, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó el efecto de ninguno de los tratamientos sobre el GABA (NMDA $F_{1,40}=1,552686$; n.s; NMDA y corticosterona $F_{1,40}=0,431306$; n.s.).

2.3. Efectos sobre la actividad motora:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión de NMDA produjo un aumento de actividad motora en los animales (factor Tiempo $F_{8,416}=5,317700$; $p=0,000002$). El tratamiento con corticosterona 600ng/ml no produjo modificaciones en la actividad motora (factor Tratamiento $F_{1,52}=0,985329$; n.s.), y tampoco el grupo experimental de los animales (factor Grupo $F_{1,52}=0,483648$; n.s.).

En el grupo de animales control, las comparaciones planeadas mostraron que la perfusión de NMDA produjo un pequeño aumento en la actividad motora, que no

alcanzó la significación estadística ($F_{1,52}=1,365173$; n.s.) (Fig. R17, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona produjo un aumento en la actividad motora ($F_{1,52}=6,564394$; $p=0,013341$) (Fig. R17, inferior). No se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($F_{1,52}=0,971202$; n.s.) (Fig. R18, superior).

En los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental, tanto la perfusión de NMDA como la perfusión de NMDA y corticosterona produjeron un leve aumento de la actividad motora, pero éste no alcanzó la significación estadística en ninguno de los dos casos ($F_{1,52}=1,573552$; n.s.; $F_{1,52}=2,281278$; n.s.; respectivamente) (Fig. R17, superior e inferior, respectivamente). No se observaron diferencias entre ambos tratamientos ($F_{1,52}=0,032762$; n.s.) (Fig. R18, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó la actividad motora en respuesta a la perfusión de NMDA ($F_{1,52}=0,014884$; n.s.), ni a la perfusión de NMDA y corticosterona ($F_{1,52}=0,409971$; n.s.).

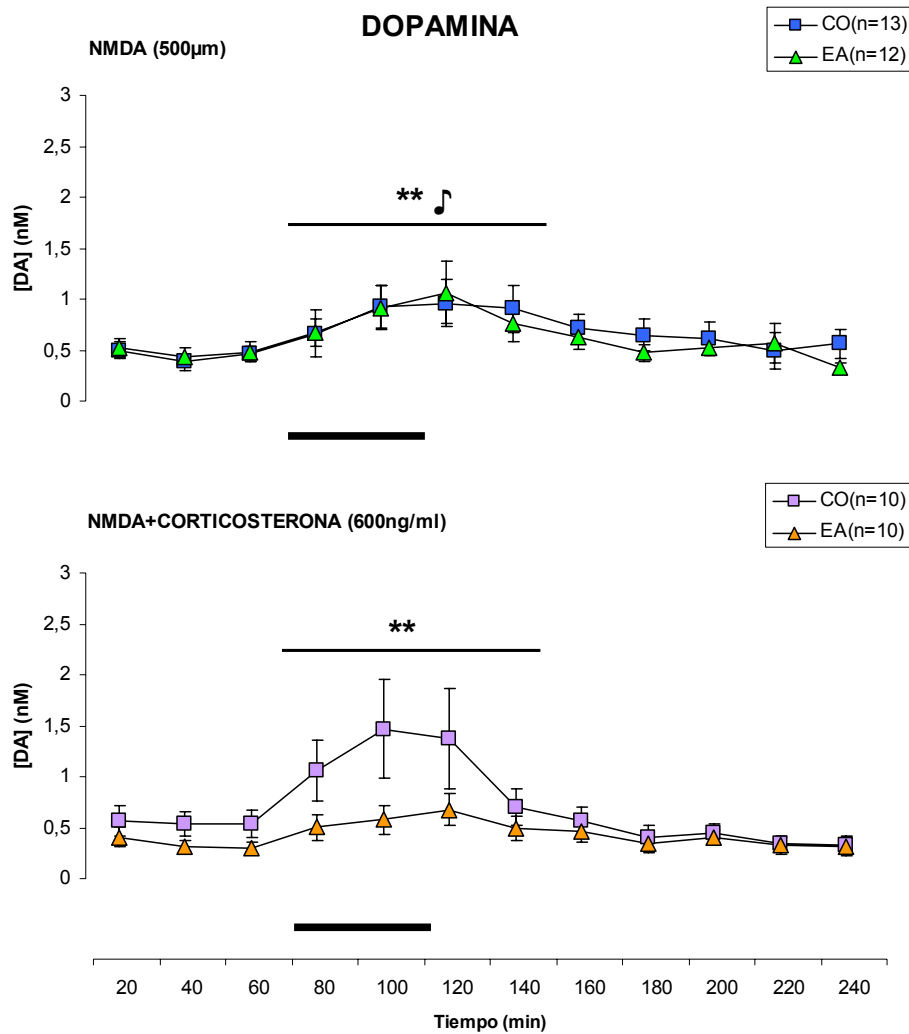


Fig. R13. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel inferior, efecto de la perfusión de NMDA junto con corticosterona (600ng/ml). Los datos (media \pm EEM) se representan como concentraciones absolutas (nM). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO ** $p < 0,01$; EA ♪ $p < 0,05$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos 20 a 60min).

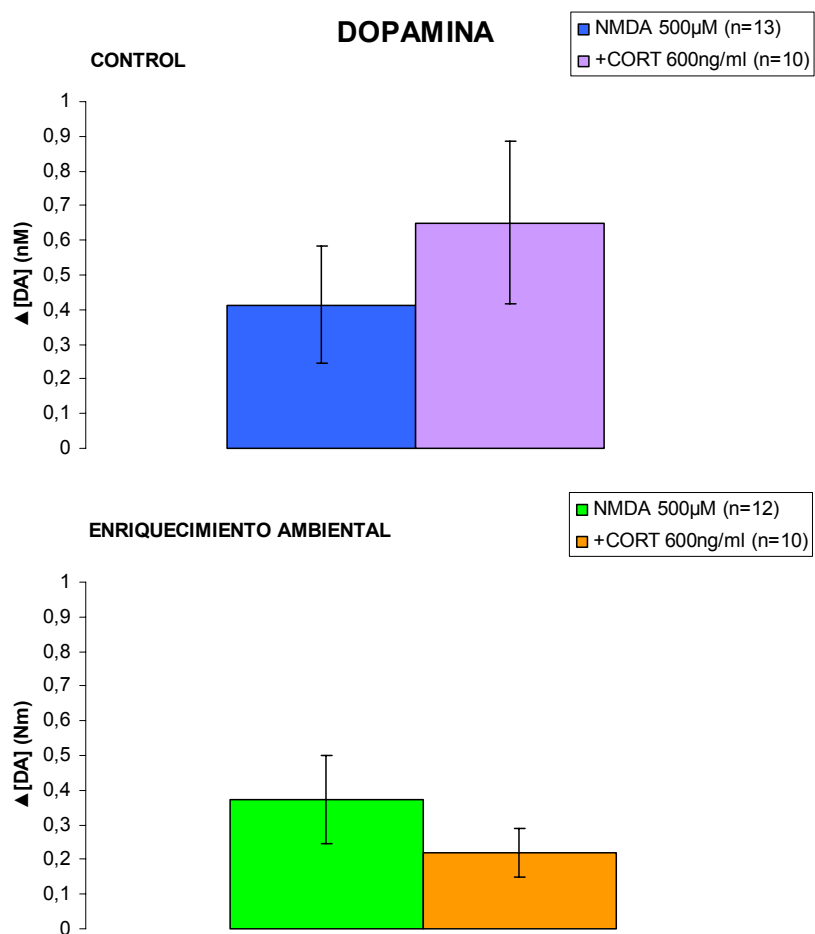


Fig. R14. Incrementos de dopamina con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media \pm EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 7 (minutos 80 a 140 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos 20 a 60 en el perfil temporal).

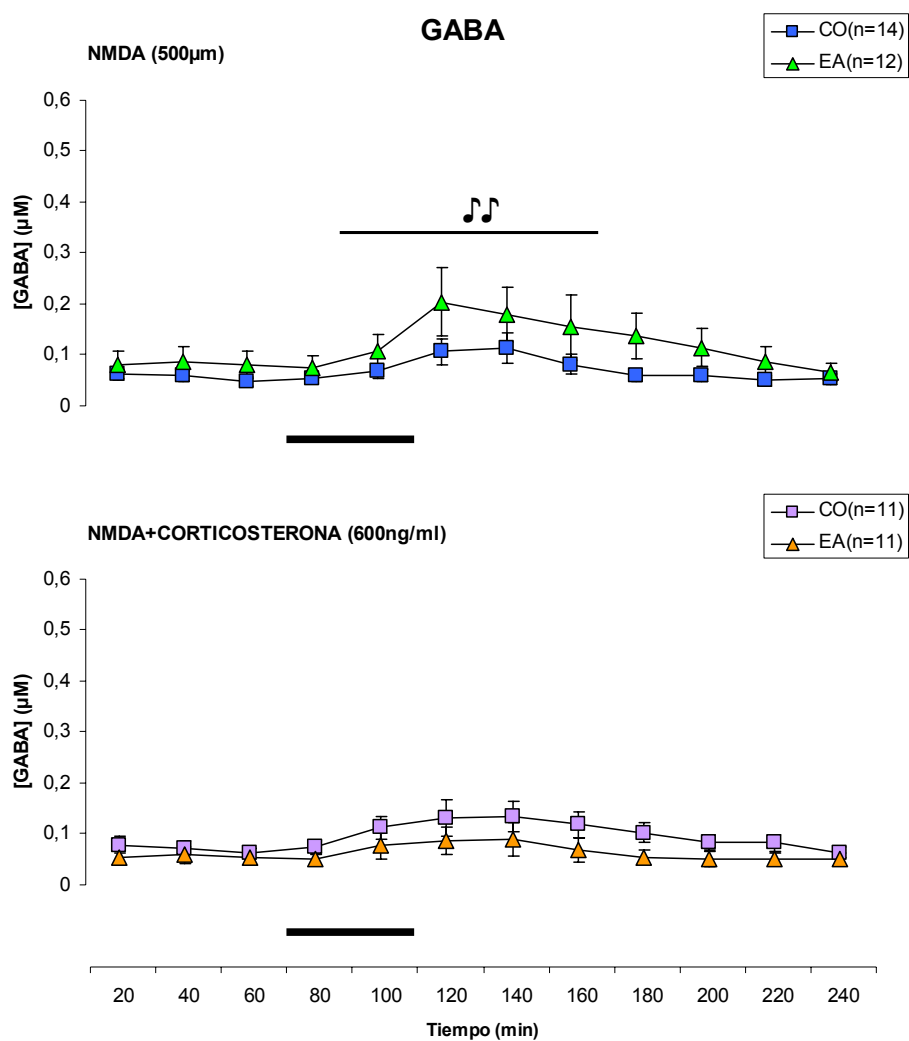


Fig. R15. Efecto de la perfusión de los distintos tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la concentración extracelular de GABA en el núcleo accumbens. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel inferior, efecto de la perfusión de NMDA junto con corticosterona (600ng/ml). Los datos (media±EEM) se representan como concentraciones absolutas (µM). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. EA 🎵 $p < 0,01$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos 20 a 60min).

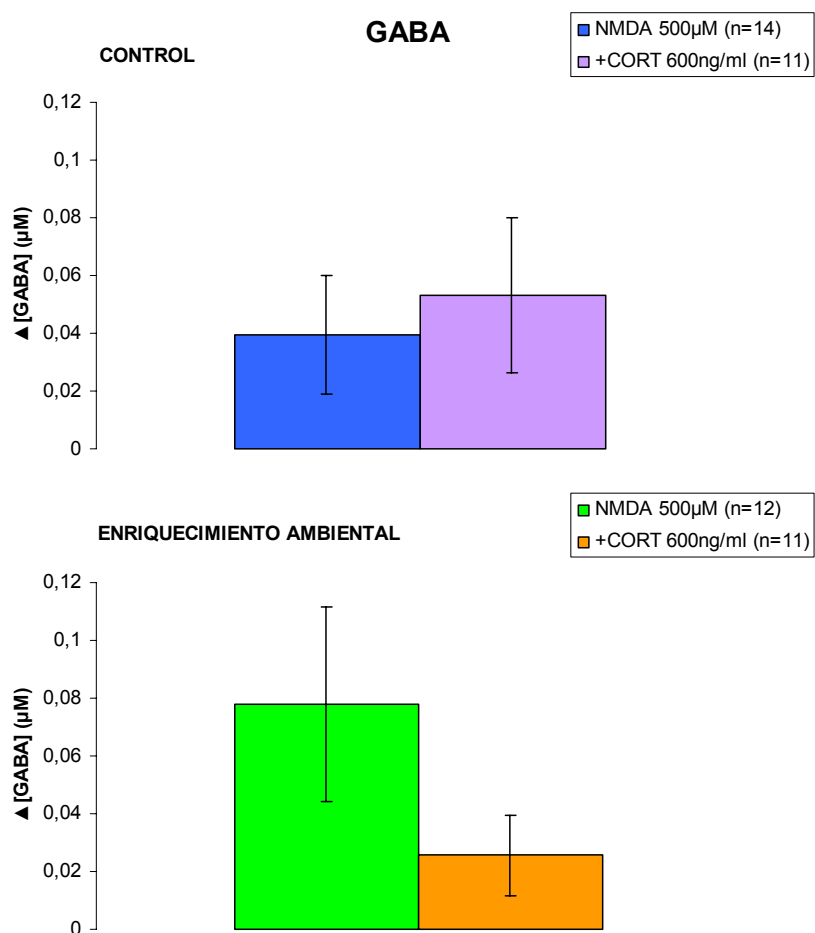


Fig. R16. Incrementos de GABA con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media \pm EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 5 a 8 (minutos 100 a 160 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos 20 a 60 en el perfil temporal).

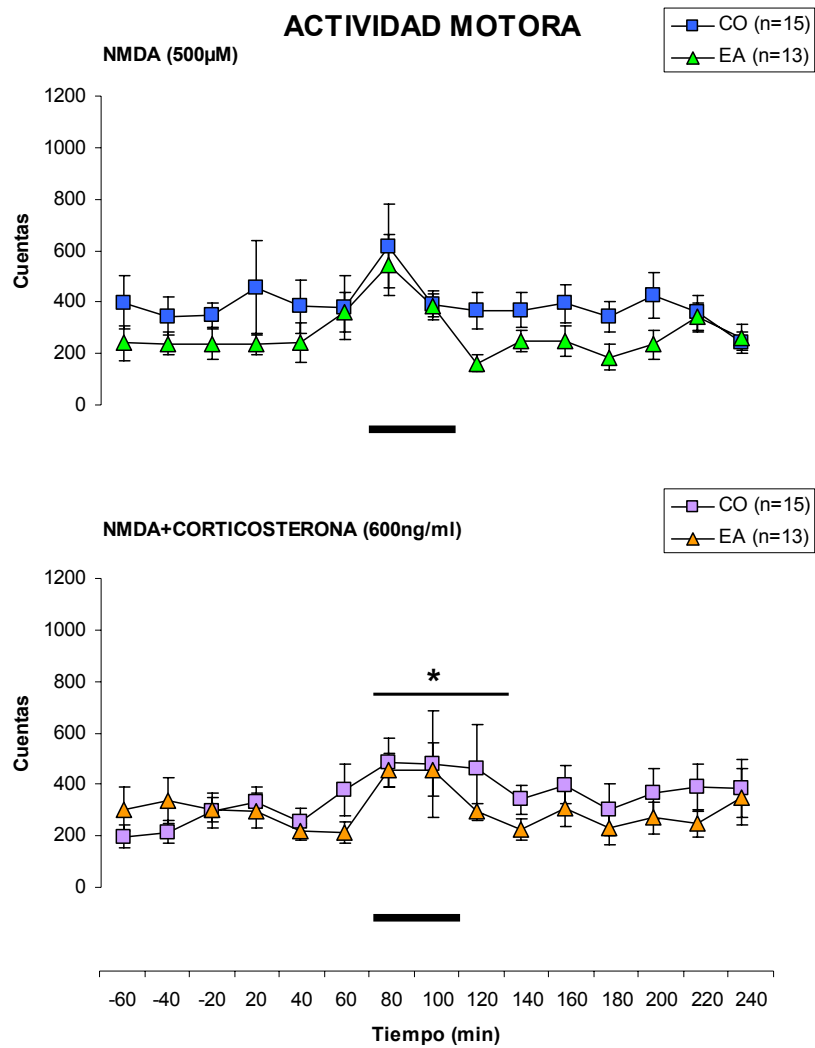


Fig. R17. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la actividad motora. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel inferior, efecto de la perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (600ng/ml). Los datos (media±EEM) se muestran como cuentas de actividad (número total de interrupciones de los haces de las células fotoeléctricas). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO * $p < 0,05$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos -60 a 60min).

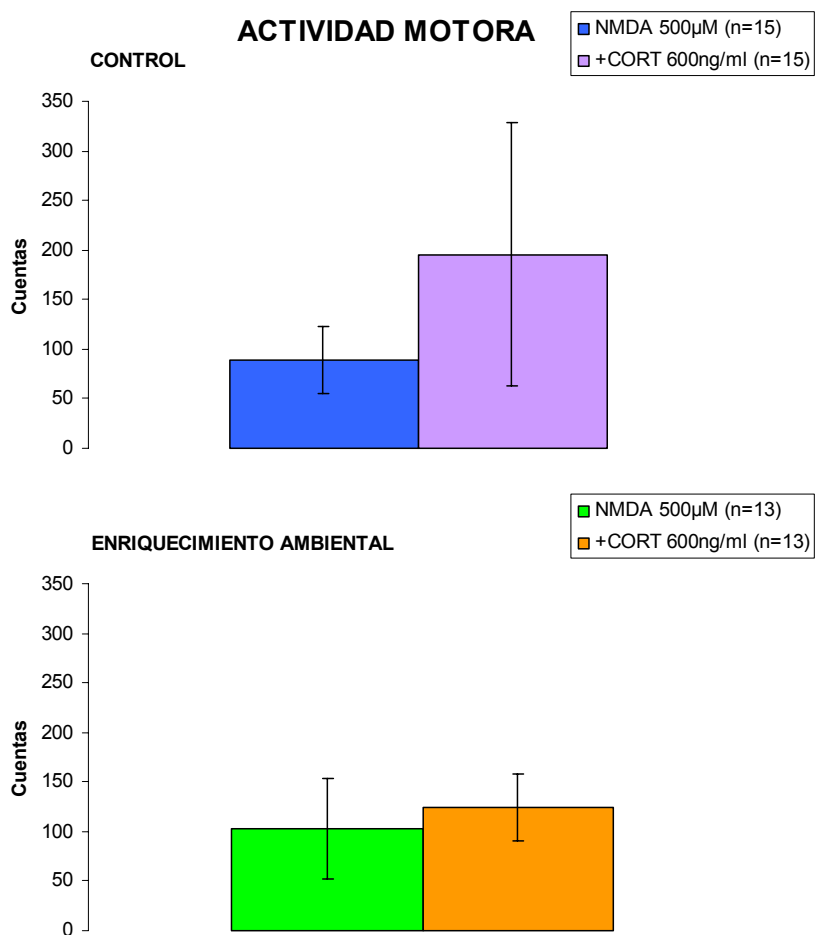


Fig. R18. Incrementos de actividad motora con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media±EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 6 (minutos 80 a 120 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos -60 a 60 en el perfil temporal).

3. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la coperfusión del agonista glutamatérgico NMDA (500 μ M) y de corticosterona (600ng/ml) en el núcleo accumbens de la rata despierta en animales de 27 meses de edad:

3.1. Efecto sobre la concentración extracelular de dopamina:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión de NMDA produjo un aumento en la concentración de dopamina (factor Tiempo $F_{8,352}=22,87655$; $p<0,000001$). Ni el tratamiento con corticosterona 600ng/ml ni el grupo experimental modificaron la concentración extracelular de dopamina (factor Tratamiento $F_{1,44}=0,55996$; n.s.; factor Grupo $F_{1,44}=0,92257$; n.s.).

El análisis *a priori* mostró que, en los animales del grupo control, la perfusión de NMDA produjo un leve aumento en la concentración extracelular de dopamina, que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,44}=2,601446$; n.s.) (Fig. R19, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona produjo un aumento de dopamina ($F_{1,44}=4,948924$; $p=0,031283$) (Fig. R19, inferior). No se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($F_{1,44}=0,187099$; n.s.) (Fig. R20, superior).

En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la concentración extracelular de dopamina se vio aumentada significativamente tanto por la perfusión de NMDA ($F_{1,44}=5,892964$; $p=0,019362$) (Fig. R19, superior), como por la perfusión de NMDA y corticosterona ($F_{1,44}=11,02282$; $p=0,001815$) (Fig. R19, inferior). No se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($F_{1,44}=0,198494$; n.s.) (Fig. R20, inferior).

El enriquecimiento ambiental no produjo diferencias en la respuesta de dopamina a ninguno de los tratamientos estudiados (NMDA $F_{1,44}=0,579935$; n.s.; NMDA y corticosterona $F_{1,44}=0,727389$; n.s.).

3.2. Efecto sobre la concentración extracelular de GABA:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión de NMDA produjo un aumento de GABA (factor Tiempo $F_{8,336}=12,90297$; $p=0,000000$), y que este aumento era diferente dependiendo de las condiciones de mantenimiento de los animales (Tiempo x Grupo $F_{8,336}=2,03369$; $p=0,041969$). El tratamiento y el grupo experimental, por

separado, no produjeron modificaciones en la concentración de GABA (factor Tratamiento $F_{1,42}=0,63710$; n.s.; factor Grupo $F_{1,42}=1,26518$; n.s.).

En el grupo control, las comparaciones planeadas mostraron que tanto la perfusión de NMDA, como la perfusión de NMDA y corticosterona no modificaron la concentración extracelular de GABA de manera significativa ($F_{1,42}=0,571062$; n.s.; $F_{1,42}=1,144755$; n.s.; respectivamente) (Fig. R21, superior e inferior, respectivamente). No se observaron diferencias entre ambos tratamientos ($F_{1,42}=0,049375$; n.s.) (Fig. R22, superior).

En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la perfusión de NMDA produjo un aumento en la concentración de GABA que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,42}=2,011480$; n.s.) (Fig. R21, superior). La perfusión de NMDA y corticosterona produjo un aumento de GABA ($F_{1,42}=7,711103$; $p=0,008165$) (Fig. R21, inferior). No se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($F_{1,42}=0,432534$; n.s.) (Fig. R22, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó la concentración de GABA en respuesta a ninguno de los tratamientos estudiados (NMDA $F_{1,42}=0,421807$; n.s.; NMDA y corticosterona $F_{1,42}=1,590553$; n.s.).

3.3. Efecto sobre la actividad motora:

El ANOVA de tres vías mostró que la perfusión de NMDA produjo un aumento en la actividad motora de los animales ($F_{8,400}=8,046206$; $p=0,000000$). La actividad motora no se vio afectada por el tratamiento con corticosterona 600ng/ml ni por las condiciones de mantenimiento de los animales (factor Tratamiento $F_{1,50}=1,429806$; n.s.; factor Grupo $F_{1,50}=0,713776$; n.s.).

Las comparaciones planeadas mostraron que, en el grupo control, la perfusión de NMDA produjo un aumento en la actividad motora de los animales ($F_{1,50}=4,668872$; $p=0,035531$) (Fig. R23, superior). La perfusión conjunta de NMDA y corticosterona produjo un leve aumento de la actividad motora, que no alcanzó la significación estadística ($F_{1,50}=1,494832$; n.s.) (Fig. R23, inferior). Las diferencias en actividad motora producidas por ambos tratamientos no alcanzaron la significación estadística ($F_{1,50}=0,440039$; n.s.) (Fig. R24, superior).

En el grupo mantenido en enriquecimiento ambiental, la actividad motora de los animales se vio incrementada tanto por la perfusión de NMDA ($F_{1,50}=4,774260$; $p=0,033602$) (Fig. R23, superior), como por la perfusión de NMDA y corticosterona ($F_{1,50}=4,669337$; $p=0,035522$) (Fig. R23, inferior). No se observaron diferencias significativas en el efecto sobre la actividad motora entre ambos tratamientos ($F_{1,50}=0,021086$; n.s.) (Fig. R24, inferior).

El enriquecimiento ambiental no modificó la respuesta de la actividad motora a la perfusión de ninguno de los tratamientos estudiados (NMDA $F_{1,50}=0,064608$; n.s.; NMDA y corticosterona $F_{1,50}=0,560263$; n.s.).

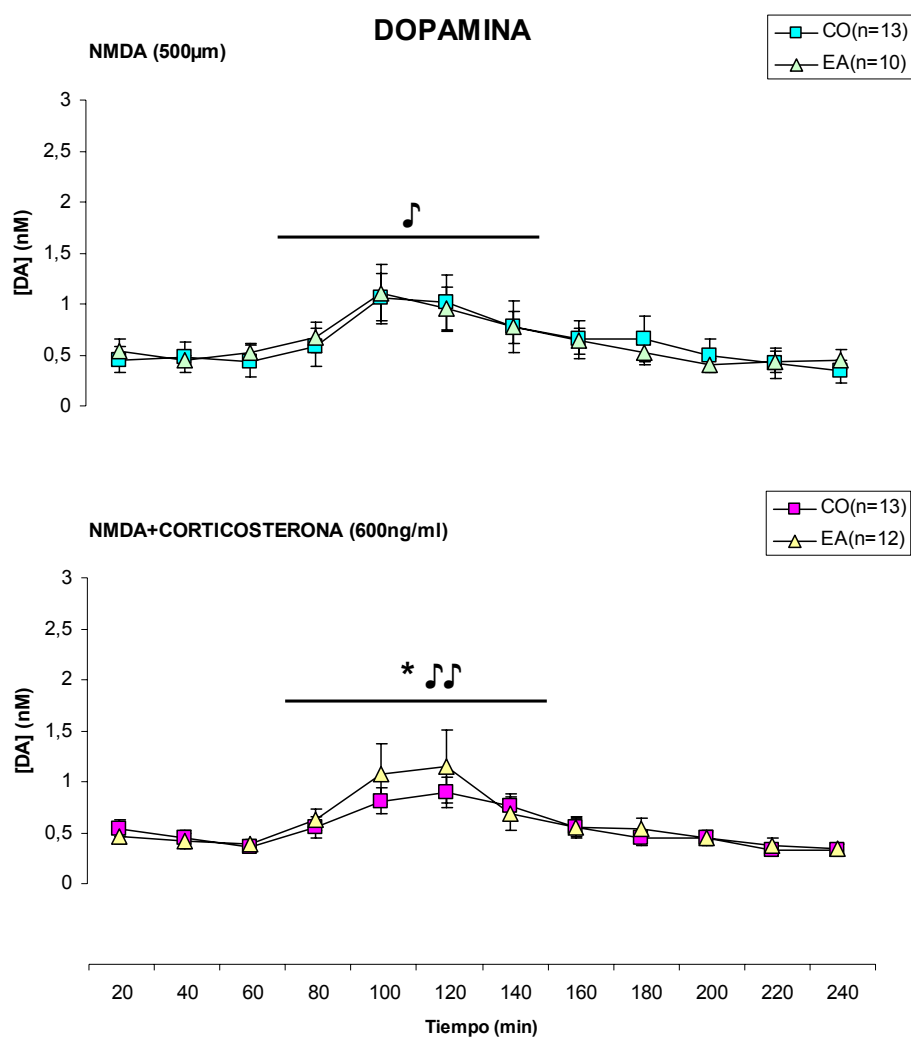


Fig. R19. Efecto de la perfusión de los distintos tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel inferior, efecto de la perfusión de NMDA junto con corticosterona (600ng/ml). Los datos (media±EEM) se representan como concentraciones absolutas (nM). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO * $p < 0,05$; EA ♪ $p < 0,05$; ♪♪ $p < 0,01$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos 20 a 60min).

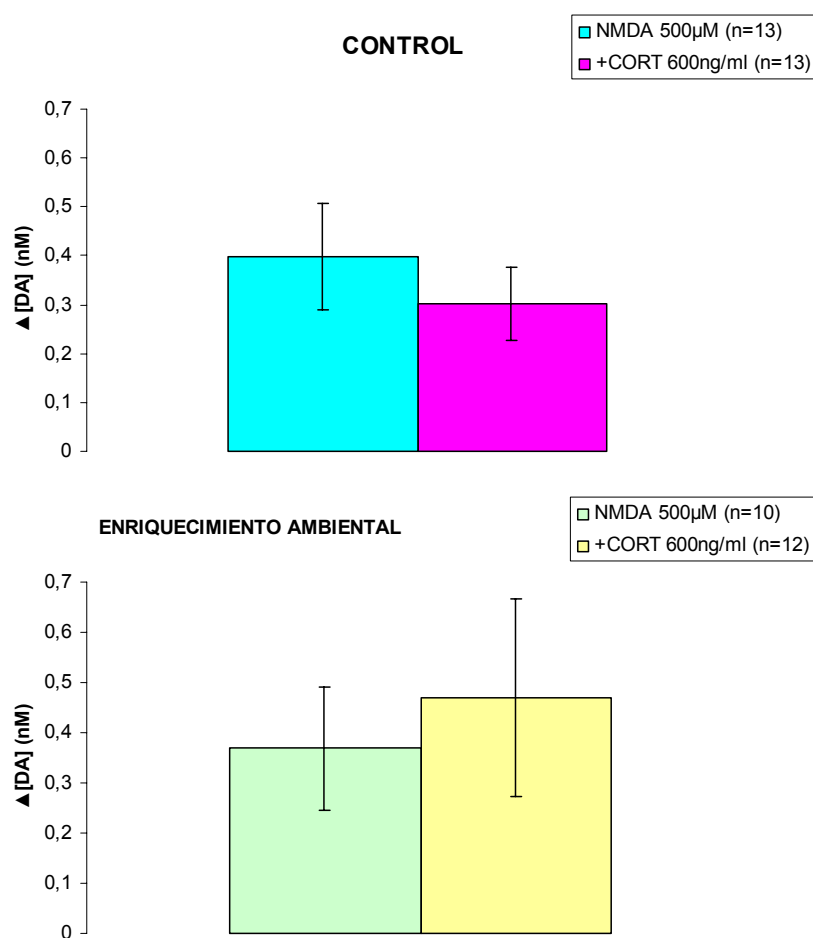


Fig. R20. Incrementos de dopamina con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media \pm EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 7 (minutos 80 a 140 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos 20 a 60 en el perfil temporal).

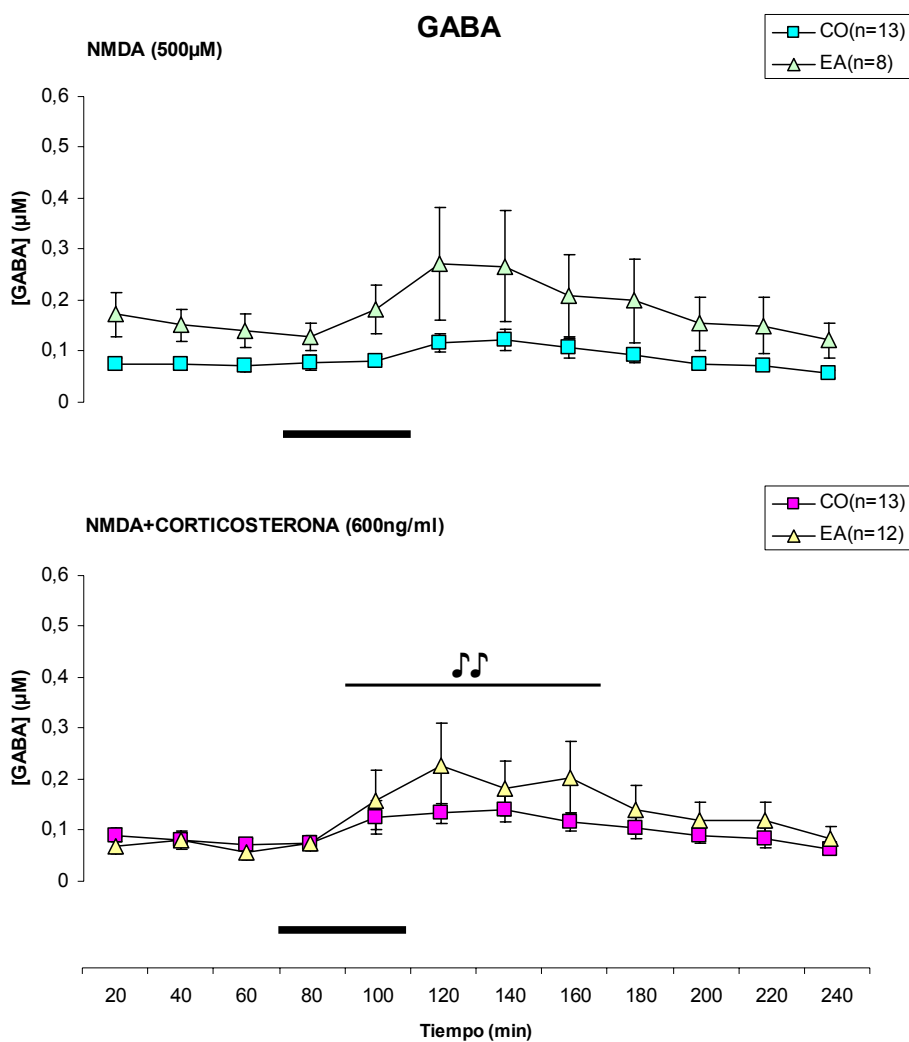


Fig. R21. Efecto de la perfusión de los distintos tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la concentración extracelular de GABA en el núcleo accumbens. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel inferior, efecto de la perfusión de NMDA junto con corticosterona (600ng/ml). Los datos (media±EEM) se representan como concentraciones absolutas (μM). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. EA $\text{p} < 0,01$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos 20 a 60min).

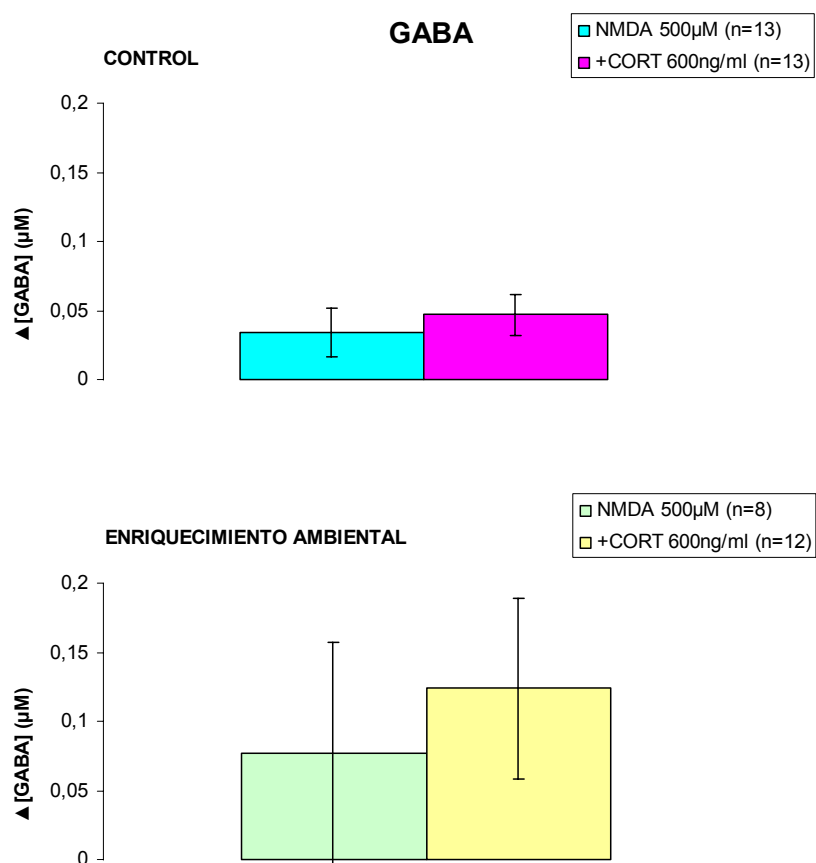


Fig. R22. Incrementos de GABA con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media \pm EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 5 a 8 (minutos 100 a 160 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos 20 a 60 en el perfil temporal).

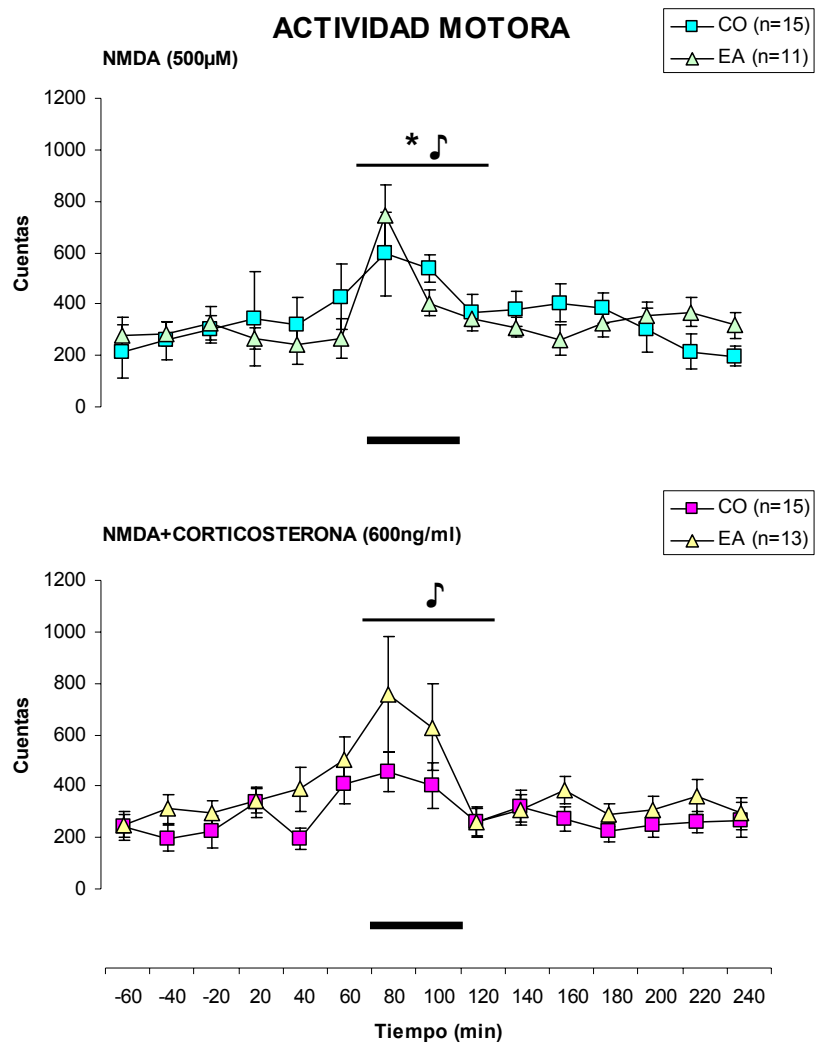


Fig. R23. Efecto de la perfusión de los diferentes tratamientos (40min, barra negra en la escala de tiempo) sobre la actividad motora. Panel superior, efecto de la perfusión de NMDA. Panel inferior, efecto de la perfusión conjunta de NMDA y corticosterona (600ng/ml). Los datos (media \pm EEM) se muestran como cuentas de actividad (número total de interrupciones de los haces de las células fotoeléctricas). CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. CO * $p < 0,05$; EA ♪ $p < 0,05$ con respecto a sus niveles basales (promedio de los perfundidos -60 a 60min).

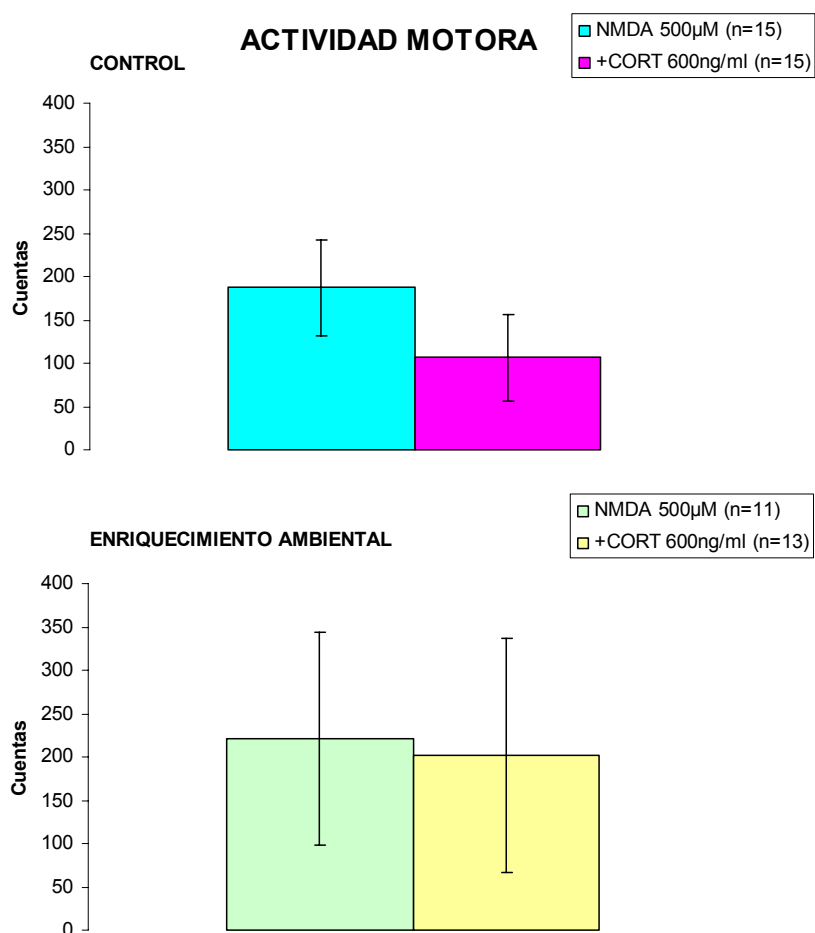


Fig. R24. Incrementos de actividad motora con respecto a los niveles basales producidos por la perfusión de NMDA o NMDA junto con corticosterona (CORT) en los diferentes grupos experimentales. Los datos (media±EEM) muestran el promedio del incremento de las muestras 4 a 6 (minutos 80 a 120 en el perfil temporal) frente a los niveles basales (minutos -60 a 60 en el perfil temporal).

4. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de receptores en el núcleo accumbens y estriado de la rata:

4.1. Núcleo accumbens:

4.1.1. Expresión de receptores NMDA:

El ANOVA de dos vías mostró que ni el enriquecimiento ambiental ni el envejecimiento modificaron la expresión de las subunidades NR1.0 (factor Grupo $F_{1,37}=1,773205$; n.s.; factor Edad $F_{2,37}=1,457567$; n.s.), NR2A (factor Grupo $F_{1,37}=0,402680$; n.s.; factor Edad $F_{2,37}=0,147459$; n.s.), NR2B (factor Grupo $F_{1,38}=1,399026$; n.s.; factor Edad $F_{2,38}=0,776163$; n.s.) ni NR3A (factor Grupo $F_{1,37}=1,091503$; n.s.; factor Edad $F_{2,37}=2,489547$; n.s.).

El análisis *a priori* mostró que la expresión de NR1.0 no se vio afectada por el envejecimiento ni en el grupo de animales control ni en el de animales mantenidos en enriquecimiento ambiental. Sin embargo, el enriquecimiento ambiental aumentó la expresión de NR1.0 en el grupo de 15 meses de edad ($F_{1,37}=4,711026$; $p=0,036460$) (fig. R25).

El envejecimiento no modificó la expresión de las subunidades NR2A y NR2B en los animales control, ni en los mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de NR2A ni NR2B en ninguno de los grupos de edad estudiados (fig. R25).

Finalmente, la expresión de NR3A no fue modificada por el envejecimiento en los animales control. En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la expresión de NR3A fue mayor en los animales de 15 meses comparado con los de 6 meses ($F_{1,37}=4,688115$; $p=0,036892$). El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de NR3A en ninguno de los grupos de edad (fig. R25).

4.1.2. Expresión de receptores AMPA:

El ANOVA de dos vías mostró que ni el enriquecimiento ambiental ni el envejecimiento modificaron la expresión de las subunidades GluR1 (factor Grupo

$F_{1,37}=3,732852$; n.s.; factor Edad $F_{2,37}=1,499894$; n.s.), GluR3 (factor Grupo $F_{1,36}=2,726762$; n.s.; factor Edad $F_{2,36}=1,347188$; n.s.) ni GluR4 (factor Grupo $F_{1,37}=1,013440$; n.s.; factor Edad $F_{2,37}=1,762927$; n.s.). El envejecimiento modificó de manera significativa la expresión de la subunidad GluR2 ($F_{2,36}=8,086453$; $p=0,001257$), de manera diferente en ambos grupos experimentales (Edad x Grupo $F_{2,36}=5,401784$; $p=0,008880$).

El análisis *a priori* mostró que la expresión de la subunidad GluR1 no se vio modificada por el envejecimiento en el grupo de animales control, ni en el mantenido en condiciones de enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental aumentó significativamente la expresión de GluR1 en los animales de 15 meses ($F_{1,37}=5,761286$; $p=0,021529$) (fig. R26).

En los animales control, la expresión de GluR2 aumentó significativamente en los animales de 27 meses de edad con respecto a los de 6 meses ($F_{1,36}=7,750281$; $p=0,008505$) y a los de 15 meses ($F_{1,36}=5,364671$; $p=0,026356$). En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la expresión de GluR2 en animales de 15 meses fue significativamente mayor que en los de 6 meses ($F_{1,36}=22,08461$; $p=0,000038$). En los animales de 15 meses, el enriquecimiento ambiental produjo un aumento significativo de la expresión de la subunidad GluR2 al compararlos con los animales control ($F_{1,36}=19,79653$; $p=0,000080$) (fig. R26).

La expresión de GluR3 no se vio afectada por el envejecimiento en el grupo control ni en el grupo de enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental incrementó de manera significativa la expresión de GluR3 en los animales de 15 meses ($F_{1,36}=4,443174$; $p=0,042069$) (fig. R26).

Por último, el envejecimiento no modificó significativamente la expresión de la subunidad GluR4 en los animales control, ni en los mantenidos en enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de GluR4 en ninguno de los grupos de edad estudiados (fig. R26).

4.1.3. Expresión de receptores de glucocorticoides:

El ANOVA de dos vías mostró que ni el enriquecimiento ambiental ni el envejecimiento modificaron la expresión de los receptores de glucocorticoides (factor

Grupo $F_{1,36}=0,048596$; n.s.; factor Edad $F_{2,36}=0,292680$; n.s.) ni la de los receptores de mineralocorticoides (factor Grupo $F_{1,36}=1,443478$; n.s.; factor Edad $F_{2,36}=3,121425$; n.s.).

El análisis *a priori* mostró que la expresión de receptores de glucocorticoides no se vio modificada por el envejecimiento en los animales control, ni en los mantenidos en enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de los receptores de glucocorticoides en ninguno de los grupos de edad estudiados (fig. R27, superior).

En el grupo control, la expresión de receptores de mineralocorticoides fue significativamente mayor en los animales de 27 meses que en los de 6 meses ($F_{1,36}=5,235425$; $p=0,028109$). En el grupo mantenido en enriquecimiento ambiental, el envejecimiento no modificó la expresión de receptores de mineralocorticoides. El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de receptores de mineralocorticoides en ninguno de los grupos de edad estudiados (fig. R27, inferior).

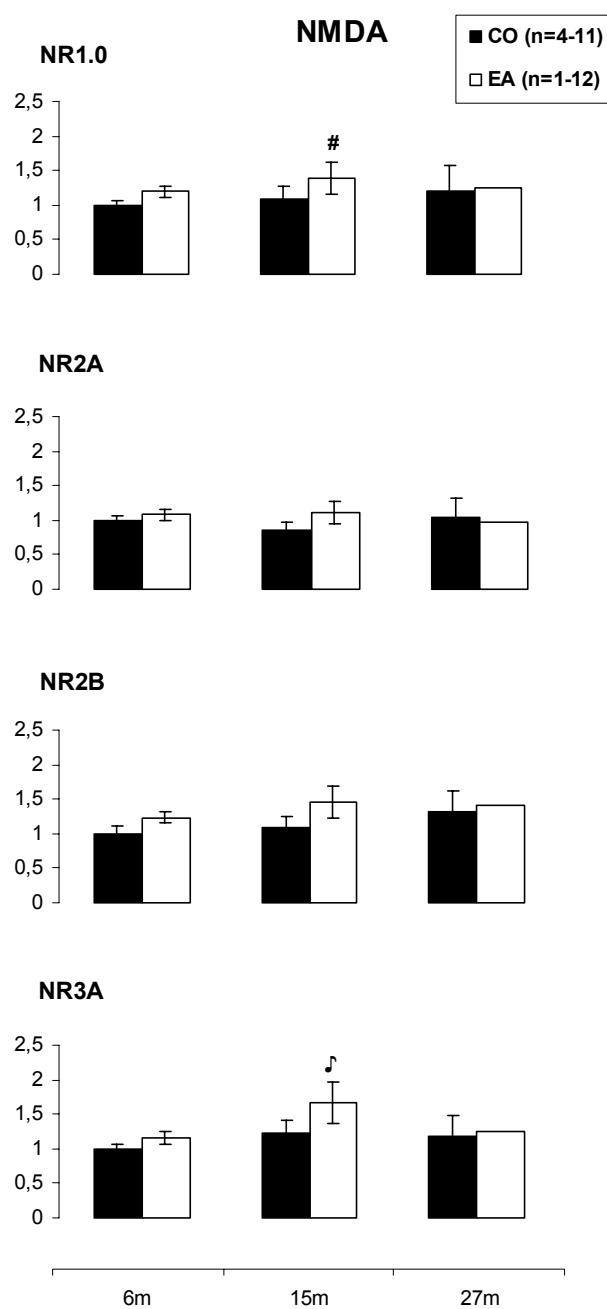


Fig. R25. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de receptores NMDA en el núcleo accumbens. CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. 6m = 6 meses; 15m = 15 meses; 27m = 27 meses. CO vs. EA # $p < 0,05$; EA ♪ $p < 0,05$ con respecto a 6m.

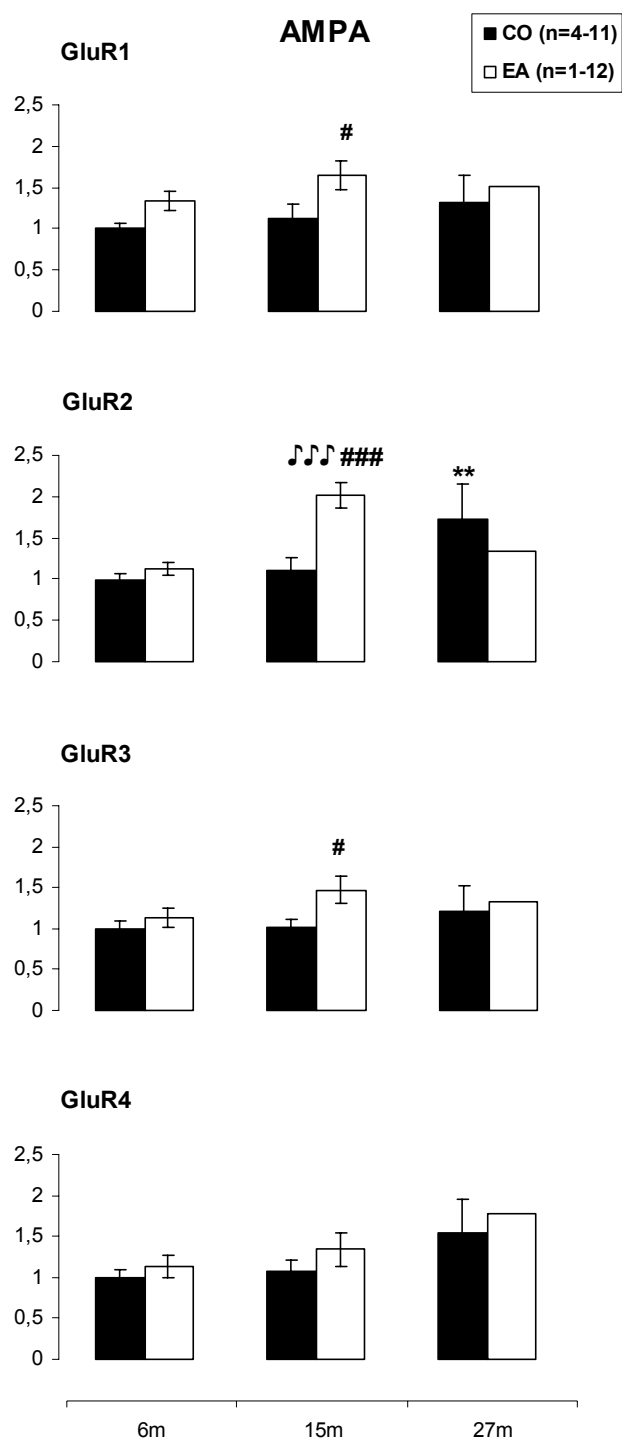


Fig. R26. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de receptores AMPA en el núcleo accumbens. CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. 6m = 6 meses; 15m = 15 meses; 27m = 27 meses. CO vs. EA ### $p < 0,001$; # $p < 0,05$; CO ** $p < 0,01$ con respecto a 6m; EA 🎵🎵 $p < 0,001$ con respecto a 6m.

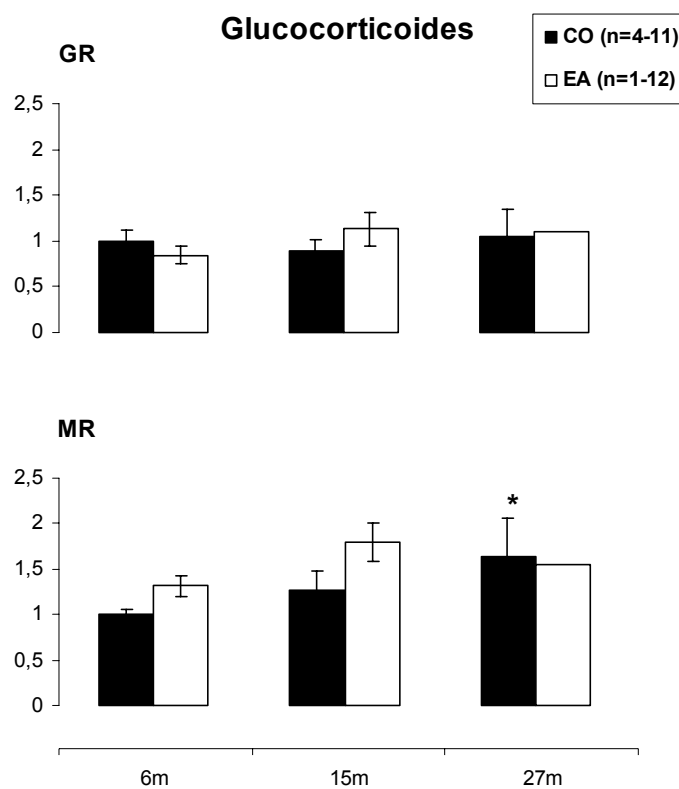


Fig. R27. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de receptores de glucocorticoides en el núcleo accumbens. CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. 6m = 6 meses; 15m = 15 meses; 27m = 27 meses. GR = receptor de glucocorticoides; MR = receptor de mineralocorticoides. CO * $p < 0,05$ con respecto a 6m.

4.2. Estriado:

4.2.1. Expresión de receptores NMDA:

El ANOVA de dos vías mostró que el enriquecimiento ambiental y el envejecimiento no modifican la expresión de las subunidades NR1.0 (factor Grupo $F_{1,49}=0,385997$; n.s.; factor Edad $F_{2,49}=0,582271$; n.s.), NR2A (factor Grupo $F_{1,49}=0,406190$; n.s.; factor Edad $F_{2,49}=0,634129$; n.s.), NR2B (factor Grupo $F_{1,48}=0,463543$; n.s.; factor Edad $F_{2,48}=2,449925$; n.s.) ni NR3A (factor Grupo $F_{1,52}=1,958486$; n.s.; factor Edad $F_{2,52}=1,914589$; n.s.).

El análisis *a priori* mostró que el envejecimiento no modificó la expresión de las subunidades NR1.0, NR2A ni NR2B en los animales del grupo control, ni en los mantenidos en enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de NR1.0, NR2A o NR2B en ninguno de los grupos de edad estudiados (fig. R28).

El envejecimiento no modificó la expresión de la subunidad NR3A en el grupo de animales control. En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la expresión de NR3A fue significativamente mayor en los animales de 27 meses que en los de 6 meses ($F_{1,52}=8,416958$; $p=0,005438$) y que en los de 15 meses ($F_{1,52}=4,589793$; $p=0,036865$) (fig. R28).

4.2.2. Expresión de receptores AMPA:

El ANOVA de dos vías mostró que ni el enriquecimiento ambiental ni el envejecimiento modifican la expresión de la subunidad GluR1 (factor Grupo $F_{1,53}=3,310035$; n.s.; factor Edad $F_{2,53}=2,163691$; n.s.). La expresión de la subunidad GluR2 se vio modificada significativamente por el envejecimiento (factor Edad $F_{2,46}=6,494417$; $p=0,003279$), aunque no por el enriquecimiento ambiental (factor Grupo $F_{1,46}=0,056811$; n.s.). La expresión de la subunidad GluR3 se vio modificada significativamente por el enriquecimiento ambiental (factor Grupo $F_{1,45}=4,766525$; $p=0,034274$) y por el envejecimiento (factor Edad $F_{2,45}=6,262044$; $p=0,003987$). La expresión de GluR4 se vio afectada de manera significativa por el enriquecimiento ambiental (factor Grupo $F_{1,42}=5,090933$; $p=0,029316$), pero no por el envejecimiento (factor Edad $F_{2,42}=2,066117$; n.s.).

El análisis *a priori* mostró que el envejecimiento no modificó la expresión de GluR1 en los animales control, sin embargo, en el grupo mantenido en enriquecimiento ambiental, la expresión de GluR1 fue significativamente mayor en los animales de 27 meses que en los de 6 meses ($F_{1,53}=5,836057$; $p=0,019180$). El enriquecimiento ambiental incrementó significativamente la expresión de GluR1 en los animales de 27 meses ($F_{1,52}=4,472513$; $p=0,039164$) (fig. R29).

En el grupo de animales control, la expresión de GluR2 en los animales de 27 meses de edad fue significativamente mayor que en los animales de 6 meses ($F_{1,46}=7,482446$; $p=0,008821$). En el grupo de animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la expresión de GluR2 en los animales de 27 meses también fue significativamente mayor que en los animales de 6 meses ($F_{1,46}=5,333894$; $p=0,025456$). El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de GluR2 en ninguno de los grupos de edad estudiados (fig. R29).

En los animales del grupo control, el envejecimiento no modificó la expresión de GluR3. En los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental, la expresión de GluR3 en los animales de 15 y 27 meses fue significativamente mayor que en los animales de 6 meses ($F_{1,45}=4,700639$; $p=0,035478$ y $F_{1,45}=13,17218$; $p=0,000723$; respectivamente). En los animales de 27 meses, el enriquecimiento ambiental aumentó significativamente la expresión de GluR3 ($F_{1,45}=4,591770$; $p=0,037570$) (fig. R29).

En los animales control, el envejecimiento no modificó la expresión de GluR4. En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la expresión de GluR4 en los animales de 15 y 27 meses fue significativamente mayor que en los animales de 6 meses ($F_{1,42}=4,504545$; $p=0,039744$ y $F_{1,42}=5,485794$; $p=0,023987$; respectivamente). El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de GluR4 en ninguno de los grupos de edad estudiados (fig. R29).

4.2.3. Expresión de receptores de glucocorticoides:

El ANOVA de dos vías mostró que ni el enriquecimiento ambiental ni el envejecimiento modifican la expresión del receptor de glucocorticoides (factor Grupo $F_{1,47}=0,375570$; n.s.; factor Edad $F_{2,47}=2,426370$; n.s.) ni del receptor de mineralocorticoides (factor Grupo $F_{1,47}=0,370779$; n.s.; factor Edad $F_{2,47}=2,305318$; n.s.).

La expresión de los receptores de glucocorticoides no fue modificada por el envejecimiento en los animales control. En el grupo mantenido en enriquecimiento ambiental, la expresión de receptores de glucocorticoides en los animales de 15 meses fue mayor que en los de 6 meses ($F_{1,47}=5,693147$; $p=0,021112$). El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de receptores de glucocorticoides en ninguno de los grupos de edad (Fig. R30, superior).

El envejecimiento no modificó la expresión de los receptores de mineralocorticoides en el grupo de animales control, ni en el grupo de enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental no modificó la expresión de receptores de mineralocorticoides en ninguno de los grupos de edad estudiados (fig. R30, inferior).

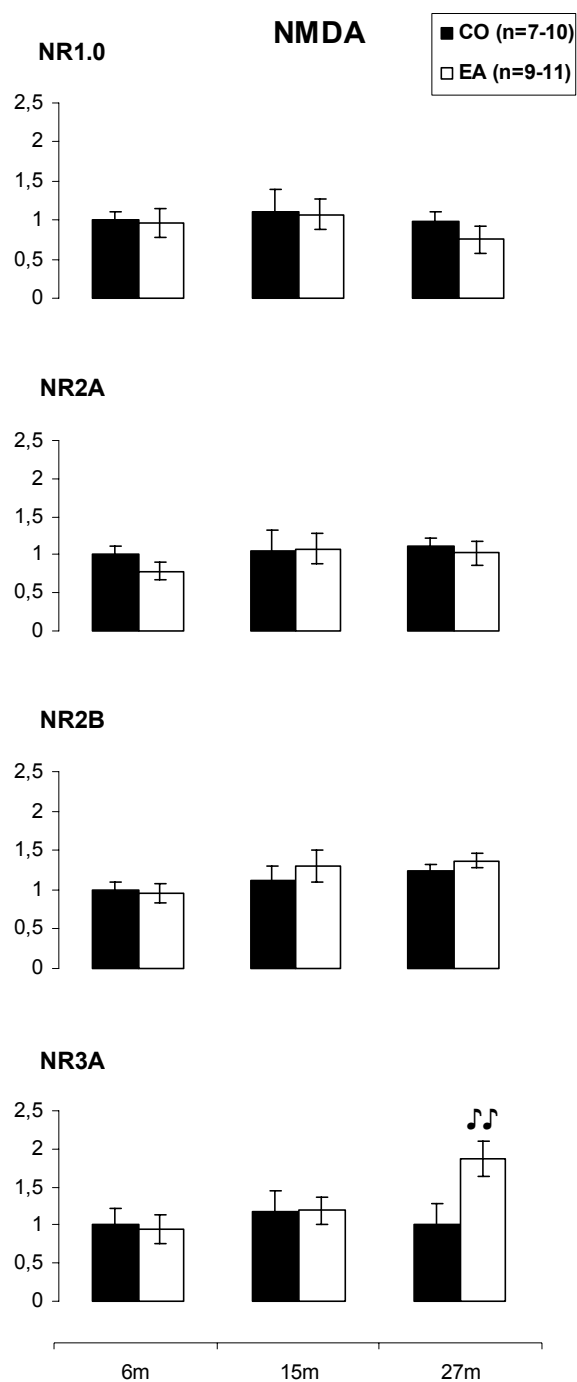


Fig. R28. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de receptores NMDA en estriado. CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. 6m = 6 meses; 15m = 15 meses; 27m = 27 meses. EA ♪♪ $p < 0,01$; $p < 0,05$ con respecto a 6m.

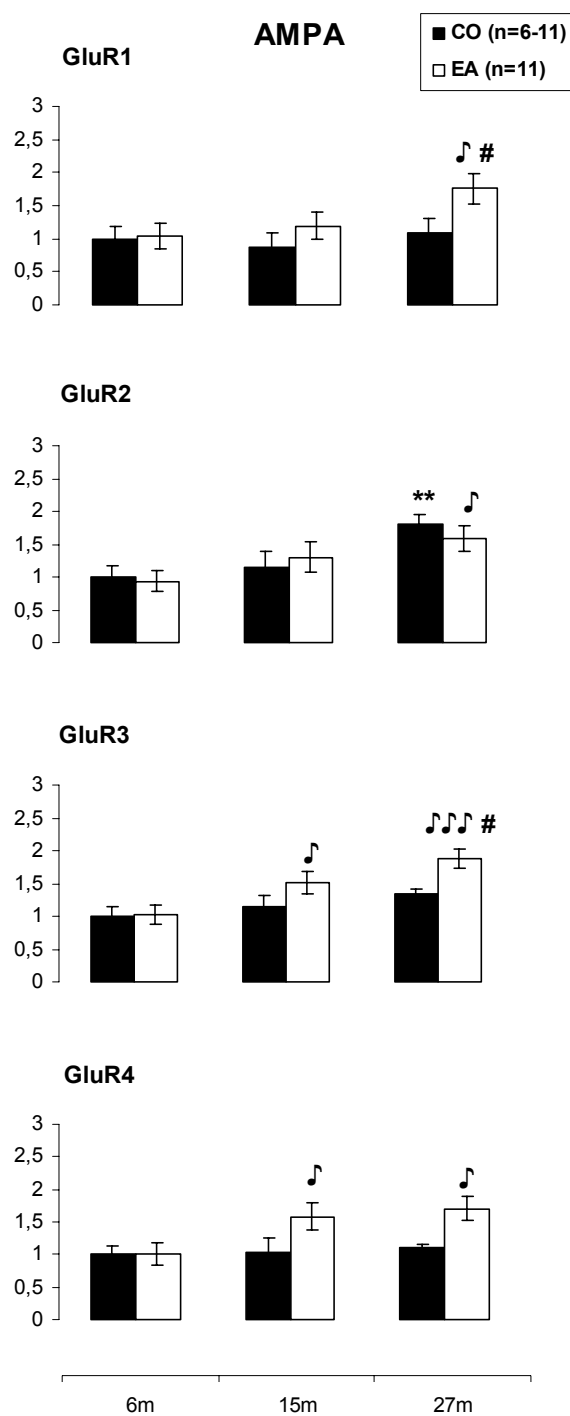


Fig. R29. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de receptores AMPA en estriado. CO = grupo control; EA = enriquecimiento ambiental. 6m = 6 meses; 15m = 15 meses; 27m = 27 meses. CO vs. EA # $p < 0,05$; CO ** $p < 0,01$ con respecto a 6m; EA ♫♫♫ $p < 0,001$; ♫ $p < 0,05$ con respecto a 6m.

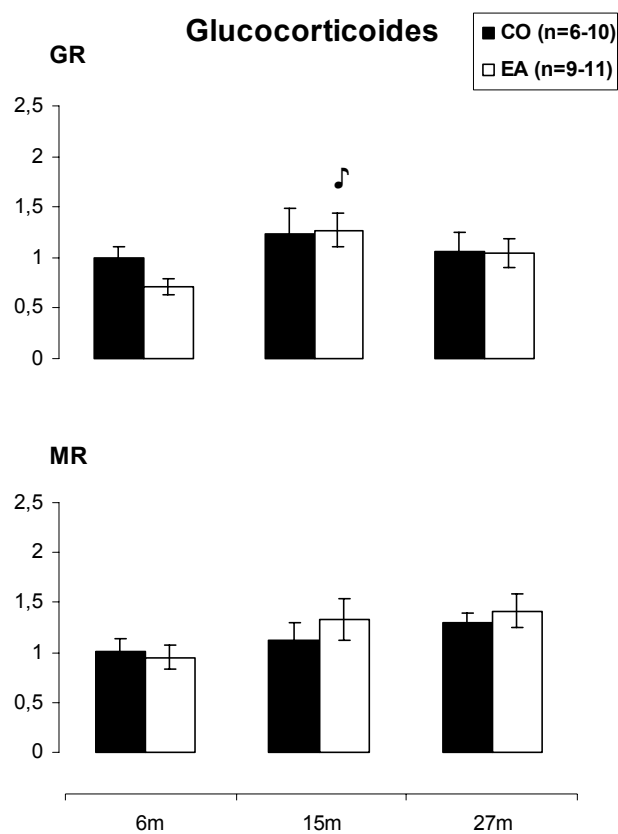


Fig. R30. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la expresión de receptores de glucocorticoides en estriado. CO= grupo control; EA= enriquecimiento ambiental. 6m = 6 meses; 15m = 15 meses; 27m = 27 meses. GR = receptor de glucocorticoides; MR = receptor de mineralocorticoides. EA ♪ $p < 0,05$ con respecto a 6m.

5. Efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento sobre la actividad motora espontánea de los animales de 6 y 27 meses de edad:

5.1. Efecto sobre la actividad horizontal:

El ANOVA de tres vías mostró que los animales redujeron su actividad motora a lo largo del experimento (factor Tiempo $F_{11,396}=54,57227$; $p<0,000001$). La edad de los animales también tuvo un efecto significativo sobre la actividad motora horizontal (factor Edad $F_{1,36}=32,86432$; $p=0,000002$; Edad x Tiempo $F_{11,396}=13,13897$; $p<0,000001$). El grupo experimental no modificó la actividad motora horizontal de los animales (factor Grupo $F_{1,36}=3,68920$; n.s.).

El análisis *a priori* mostró que en los animales control, la actividad motora de los animales de 27 meses de edad fue significativamente menor que la de los animales de 6 meses ($F_{1,36}=27,50113$; $p=0,000007$) (Fig. R31).

En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la edad también redujo significativamente la actividad motora horizontal ($F_{1,36}=7,792866$; $p=0,008342$) (Fig. R31).

El enriquecimiento ambiental redujo la actividad motora horizontal total en los animales de 6 meses de edad ($F_{1,36}=8,200361$; $p=0,006943$), pero no en los animales de 27 meses de edad ($F_{1,36}=0,000072$; n.s.).

5.2. Efecto sobre la actividad vertical:

El ANOVA de tres vías mostró que la actividad vertical de los animales disminuyó a lo largo del experimento (factor Tiempo $F_{11,407}=35,85242$; $p<0,000001$) y con la edad (factor Edad $F_{1,37}=65,844468$; $p=0,000000$). El efecto del tiempo sobre la actividad vertical fue diferente dependiendo de la edad y de las condiciones de mantenimiento de los animales (Edad x Tiempo $F_{11,407}=12,81813$; $p<0,000001$; Edad x Tiempo x Grupo $F_{11,407}=2,69099$; $p=0,002363$). El grupo experimental no modificó la actividad motora vertical de los animales (factor Grupo $F_{1,37}=0,11437$; n.s.).

Las comparaciones planeadas mostraron que, en el grupo de animales control, la edad redujo significativamente la actividad vertical ($F_{1,37}=20,87663$; $p=0,000053$) (Fig. R32).

En los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental, la edad también redujo la actividad vertical de manera significativa ($F_{1,37}=49,22535$; $p=0,000000$) (Fig. R32).

El enriquecimiento ambiental no modificó la actividad vertical total en los animales de 6 meses de edad ($F_{1,37}=1,719394$; n.s.), ni en los animales de 27 meses de edad ($F_{1,37}=0,494853$).

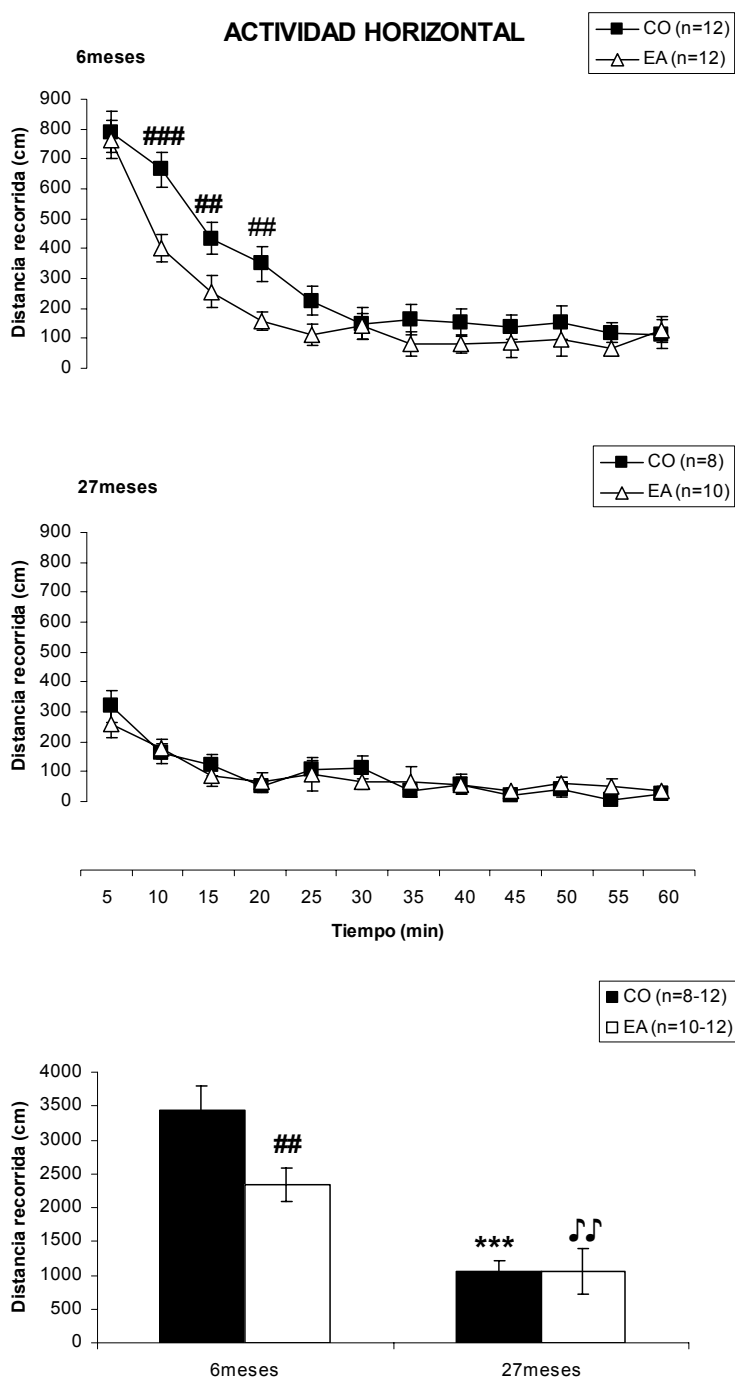


Fig. R31. Panel superior, perfil temporal de la actividad motora espontánea horizontal de los animales de 6 meses de edad. Panel central, perfil temporal de la actividad motora espontánea horizontal de los animales de 27 meses de edad. Panel inferior, actividad motora horizontal total de los animales. CO = grupo control; EA = grupo de enriquecimiento ambiental. CO vs. EA ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; CO *** $p < 0,001$ con respecto a 6 meses; EA ♪♪ $p < 0,01$ con respecto a 6 meses

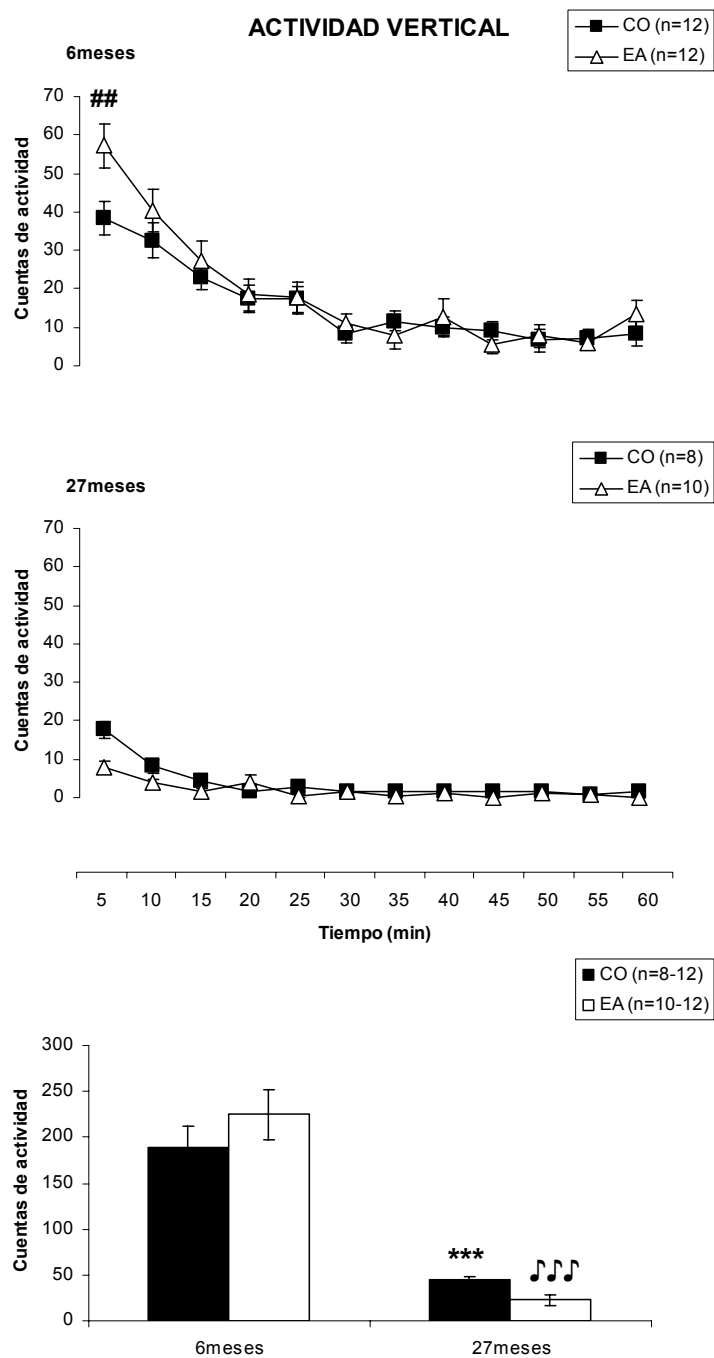


Fig. R32. Panel superior, perfil temporal de la actividad motora espontánea vertical de los animales de 6 meses de edad. Panel central, perfil temporal de la actividad motora espontánea vertical de los animales de 27 meses de edad. Panel inferior, actividad motora vertical total de los animales. CO = grupo control; EA = grupo de enriquecimiento ambiental. CO vs. EA ## $p < 0,01$; CO *** $p < 0,001$ con respecto a 6 meses; EA ♪♪♪ $p < 0,001$ con respecto a 6 meses

DISCUSIÓN

1. Acerca de los métodos.

1.1. Sobre la microdiálisis:

La microdiálisis es una técnica *in vivo* que permite evaluar la concentración de sustancias presentes en el espacio extracelular en el cerebro de los animales. Se trata de una técnica *ex situ*, ya que la cuantificación de las sustancias de estudio se realiza fuera del tejido (Benveniste, 1989; Sharp and Zetterström, 2007). La microdiálisis consiste en la introducción de una cánula concéntrica con una membrana dialítica en su extremo que se encuentra en contacto con el tejido a estudiar (Benveniste, 1989; Ungerstedt, 1991; Sharp and Zetterström, 2007). Esta membrana es permeable al agua y a pequeñas moléculas, y separa dos compartimentos fluidos. Durante la perfusión de la membrana, las moléculas pueden intercambiarse entre ambos compartimentos por diferencia de gradiente (Di Chiara, 1990; Morelli et al., 1991; Westerink, 2000), de modo que el contenido del perfundido refleja la composición del líquido extracelular (Ungerstedt, 1991).

Hay varios factores que afectan a la recuperación de sustancias del espacio extracelular, como, por ejemplo, el flujo de perfusión. Un flujo de perfusión bajo facilita la recuperación de sustancias, pero también produce una excesiva aclaración de la sustancia de estudio del medio extracelular. Además, los flujos bajos implican la necesidad de aumentar el tiempo de recogida de muestras, lo que hace que empeore la resolución temporal. Lo más usual es utilizar flujos de entre 1 y 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, que permiten una recuperación del 15-20% en un rango de tiempo de 5-20min. En base a estas consideraciones, en el presente trabajo se empleó un flujo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ y se recogieron muestras cada 20min, lo que permite tener un volumen de muestra suficiente para el análisis por separado de los neurotransmisores dopamina y GABA.

Otro factor importante es la membrana de la cánula. La longitud de la misma se elige sobre todo en función de las dimensiones del área de estudio. En la presente Tesis Doctoral se empleó una longitud de 2.5mm para estudiar el *core* del núcleo accumbens. La composición de la membrana también es importante, ya que deben ser materiales inertes que no reaccionen con las sustancias presentes en el medio o con las drogas que se perfundan a través de la cánula. El tamaño de exclusión va a permitir una selección de las sustancias que pueden atravesar la membrana, y dificulta la contaminación de las muestras con moléculas de elevado peso molecular que

interfieran en la cuantificación de las sustancias a estudiar. En el presente trabajo de investigación se utilizó una membrana de cuprofano (derivado de la celulosa) con un tamaño de exclusión molecular de 5000Da. Las cánulas de microdiálisis utilizadas fueron diseñadas y construidas en nuestro laboratorio. Sus características se describen en el apartado de Materiales y Métodos de esta Tesis, y en la bibliografía previa del laboratorio (Segovia et al., 1997). Algunas de las desventajas de este método con respecto a otros, como la voltametría, son su peor resolución temporal y espacial (Day et al., 2001;Pepeu and Giovannini, 2007;Sharp and Zetterström, 2007;Sarter et al., 2009).

A la hora de diseñar el protocolo experimental hay que tener en cuenta que, al introducir la cánula en el tejido, se causan alteraciones en la estructura y funcionalidad del mismo. Algunas de estas alteraciones son la liberación excesiva de neurotransmisores debida al daño neuronal, la ruptura de la barrera hematoencefálica así como la isquemia en la zona adyacente a la cánula (Benveniste, 1989;Robinson and Justice, 1991;Westerink, 2000;Day et al., 2001). Para evitar estos inconvenientes, en el presente trabajo se utilizaron cánulas guía, que permiten la recuperación del animal tras la cirugía y restringen la gliosis a zonas alejadas de la región de estudio. Además, el día del experimento, la recogida de muestras comenzó 3h después de la inserción de la cánula de microdiálisis en el tejido, para favorecer la estabilización de los niveles basales de neurotransmisores. También es importante la fase del ciclo luz/oscuridad en la que se realicen los experimentos. Al ser los roedores animales nocturnos, su fase de actividad coincide con la fase oscura, por lo que para acercarnos lo máximo posible a una situación fisiológica, los animales utilizados en la presente Tesis Doctoral se mantuvieron en ciclo invertido 12h/12h (luces encendidas a las 20h), y los experimentos se realizaron durante la fase oscura de dicho ciclo.

El líquido que se perfunde a través de la cánula debería tener una composición iónica parecida a la del líquido del medio extracelular (Ungerstedt, 1991), por ello se opta por líquido cefalorraquídeo sintético (LCRs) adecuado a las condiciones del líquido extracelular. Hay que controlar sobre todo la concentración de Ca^{2+} y K^{+} , ya que la actividad neuronal depende en gran medida de ellos.

1.2. Sobre el significado de las concentraciones de neurotransmisores recogidos mediante microdiálisis:

Debido a sus dimensiones, la membrana dialítica no puede situarse en el espacio sináptico, por lo que se asume que las moléculas recogidas a través de la cánula proceden del espacio extracelular pudiendo éstas proceder, bien del espacio sináptico (por difusión), o bien de una liberación directa al espacio extracelular (Timmerman and Westerink, 1997a).

Las aminas biógenas como la dopamina, se encuentran localizadas fundamentalmente en neuronas (Pepeu and Giovannini, 2007), y son liberadas directamente al espacio extracelular desde varicosidades presentes a lo largo de los axones, aunque pueden ser también liberadas en el espacio sináptico, desde donde difunden al espacio extracelular (Zoli and Agnati, 1996; Zoli et al., 1998; Vizi et al., 2010). Se considera que la concentración extracelular de dopamina medida mediante microdiálisis es de origen neuronal, ya que se reduce drásticamente en presencia de TTX o en ausencia de Ca^{2+} (Westerink et al., 1987; Westerink, 2000; Pepeu and Giovannini, 2007).

El origen del GABA es más controvertido, ya que además de en las neuronas se encuentra también en la glía (Turner and Whittle, 1983; Attwell et al., 1993; Waagepetersen et al., 1999). Las sinapsis GABAérgicas son sinapsis “cerradas”, es decir, el espacio sináptico queda rodeado de astrocitos, los cuales poseen transportadores de GABA en su membrana, lo que dificulta que el GABA sináptico pueda difundir al espacio extracelular (Haydon, 2001; del Arco et al., 2003). Sin embargo, en ciertas condiciones de alta estimulación, la liberación del neurotransmisor puede superar la capacidad tamponadora de la sinapsis, de manera que éste difunda a zonas extra-sinápticas (Isaacson et al., 1993; Scanziani, 2002). La concentración extracelular basal de GABA no se ve modificada por la presencia de TTX ni por la ausencia de Ca^{2+} , lo que indicaría que no es de origen neuronal. Sin embargo, hay estudios que muestran que tanto estimulaciones químicas como eléctricas producen incrementos en el GABA extracelular sensibles a TTX y dependientes de Ca^{2+} (Bianchi et al., 1996; Timmerman and Westerink, 1997a; Timmerman and Westerink, 1997b; Grobin and Deutch, 1998; Antonelli et al., 2000). Además, estudios sobre la interacción neurona-glía han descrito que los astrocitos pueden liberar GABA mediante una inversión de sus transportadores (Osborne et al., 1990; Levi and Raiteri, 1993; Attwell et al., 1993; Liu et al., 2000).

Podemos concluir que la fuente de GABA extracelular medido por microdiálisis sigue siendo controvertida, aunque se acepta que es un indicador de la actividad del sistema GABAérgico (Timmerman and Westerink, 1997a; del Arco et al., 2003).

1.3. Sobre el análisis cromatográfico:

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el procedimiento más empleado para el análisis de sustancias obtenidas mediante la técnica de microdiálisis. La cromatografía permite utilizar pequeños volúmenes de muestra, métodos de derivatización simples y un reducido tiempo de análisis (Lindroth and Mopper, 1979; Venema et al., 1983; Allison et al., 1984; Peinado et al., 1986).

Para el análisis de dopamina se ha utilizado la detección electroquímica, ya que permite unos límites de detección muy bajos y una alta sensibilidad (Westerink, 2000). En el presente trabajo se empleó un detector coulométrico y una célula analítica con dos electrodos en serie. La modificación de los potenciales de cada célula permite maximizar la sensibilidad y la especificidad del análisis (Anderson, 1993). La composición y pureza de la fase móvil son esenciales para modificar la separación y resolución de los picos a analizar. En nuestro caso, la concentración de dopamina se encontró entre 0.3-0.7nM, y nuestro límite de detección fue de 0.15nM.

El análisis de GABA se realizó mediante HPLC acoplada a un detector de fluorescencia, lo que requiere una derivatización previa de las muestras. En el presente trabajo elegimos la formación de OPA-derivados (con o-ftaldehído), que dan lugar a una elevada fluorescencia en un breve tiempo de reacción, aunque son derivados muy inestables (Lindroth and Mopper, 1979). Para esta reacción se necesita un grupo tiol auxiliar, y en este caso se utilizó el mercaptopropiónico, ya que da más estabilidad a los compuestos. Para minimizar el efecto de la inestabilidad de los compuestos en el análisis, se estableció un tiempo constante entre la adición del reactivo y la inyección de la muestra en el cromatógrafo (45 s). La utilización de una columna de 15cm y la elución a través de un gradiente de tipo binario (compuesto por dos fases móviles distintas) permite optimizar la separación de los picos en un tiempo de análisis de 16min. La utilización de gradientes requiere un tiempo de restablecimiento de las condiciones iniciales que, en nuestro caso, fue de 4min. Además, en el presente trabajo utilizamos un estándar interno (homoserina) que proporciona una mayor fiabilidad en la cuantificación.

1.4. Sobre el modelo de enriquecimiento ambiental:

El enriquecimiento ambiental es un modelo que permite estudiar los efectos que el ambiente tiene sobre la plasticidad cerebral (van Praag et al., 2000). En estas condiciones, los animales cuentan con una serie de estímulos sensoriales, como objetos, túneles y ruedas de ejercicio, además de la estimulación social que se consigue al mantener en la misma jaula un número de animales que oscila entre 10 y 12.

La metodología concreta utilizada en los estudios de enriquecimiento ambiental es muy variada (Simpson and Kelly, 2011). Así, entre los diferentes estudios varía el tamaño de las jaulas de enriquecimiento ambiental y el número de animales por jaula, el tiempo que los animales son mantenidos en estas condiciones (entre horas al día y meses), la edad a la que los animales son expuestos a este modelo (desde el destete o en la edad adulta), la organización y frecuencia de modificación de los objetos y túneles y la ausencia o presencia de ruedas de ejercicio y, finalmente, la cepa y sexo de los animales (Simpson and Kelly, 2011). Esta variabilidad dificulta la comparación de los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación. Otro aspecto de gran importancia es la elección del grupo control (Laviola et al., 2008; Solinas et al., 2009; Simpson and Kelly, 2011). En los estudios de enriquecimiento ambiental se utilizan habitualmente como controles animales mantenidos en condiciones estándar (entre 2 y 4 animales por jaula, sin objetos) o animales aislados (un animal por jaula, sin objetos). En el presente trabajo, los animales fueron mantenidos en enriquecimiento ambiental durante 3 meses, durante su edad adulta (partiendo de edades de 3, 12 y 24 meses, respectivamente). El grupo control elegido fueron animales aislados, con el fin de maximizar las posibles diferencias que pudieran encontrarse entre los grupos experimentales.

1.5. Sobre la PCR a tiempo real:

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*) (Saiki et al., 1986; Mullis, 1990) es una reacción que permite producir copias a partir de un molde de ADN (amplificación). Esta técnica permite analizar la cantidad de ARNm de un tejido previa síntesis de una copia de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción inversa. De esta manera, se puede estimar la expresión de genes y sus posibles cambios debidos a diferentes tratamientos experimentales.

En la PCR cuantitativa, o PCR a tiempo real, se detectan las copias de ADN según se van produciendo, gracias a técnicas de fluorescencia (Higuchi et al., 1992;Ginzinger, 2002;Bustin et al., 2005;Wong and Medrano, 2005;Valasek and Repa, 2005;Kubista et al., 2006). Con técnica se fija un valor umbral (Ct, *cycle threshold*), que es el número de ciclos a partir del cual la fluorescencia supera los valores basales de fondo, y permite comparar las diferentes muestras. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de ADN originaria de la que se parte en la reacción, de forma que cuanto más ADN haya en la muestra, menor será el valor de Ct (Ginzinger, 2002;Ding and Cantor, 2004;Wong and Medrano, 2005;Kubista et al., 2006).

En la PCR a tiempo real se utilizan dos tipos de análisis: la cuantificación absoluta o relativa a una curva patrón, y la cuantificación relativa. En la cuantificación relativa se compara el gen de estudio en un grupo “control” con un grupo “tratado”. Además hay que normalizar los datos con un gen control para evitar la variabilidad debida al paso de ARN a ADNc mediante transcripción inversa (Livak and Schmittgen, 2001;Ginzinger, 2002;Wong and Medrano, 2005). Este gen control debe cumplir unas condiciones concretas, tales como que su expresión no varíe entre las muestras a estudiar, ni con las condiciones experimentales, y que la eficiencia de su amplificación sea similar a la del gen de estudio. Algunos genes utilizados habitualmente como controles son la β -actina, GAPDH, ciclofilina, y ARN ribosómicos (Ginzinger, 2002;Huggett et al., 2005;Bustin et al., 2005;Wong and Medrano, 2005;Valasek and Repa, 2005). En el presente estudio se analizaron los datos mediante cuantificación relativa, y el gen control utilizado fue el ARN ribosómico 18S. Se comprobó que la eficacia de la reacción de amplificación fue cercana al 100% en todos los genes estudiados, al igual que en el gen control.

A la hora de analizar matemáticamente los datos, se utilizó el método de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, que corrige las Cts obtenidas para el gen de estudio con las Cts obtenidas para el gen control, y compara la expresión del gen de estudio entre los grupos “control” y “tratado”. Este método es utilizado habitualmente (Livak and Schmittgen, 2001;Ginzinger, 2002;Wong and Medrano, 2005) aunque hay que tener en cuenta que parte de unas premisas que no siempre se cumplen, como son que la eficacia de la amplificación es siempre del 100% y que la expresión del gen control no varía entre las diferentes muestras de estudio (Scheffe et al., 2006;Van Guilder et al., 2008). Con todo,

sin embargo, ha sido el método de análisis elegido en el presente trabajo ya que hemos comprobado que la eficacia de la amplificación sea similar para todos los genes estudiados, y cercana al 100%, y que la expresión del gen control utilizado (ARN ribosómico 18S) no varía según las condiciones experimentales. Para optimizar la eficacia de la reacción de amplificación se fija el valor de Ct durante la fase exponencial de la PCR, en la que las condiciones permiten que su eficacia sea máxima.

Hay varias sustancias que se pueden utilizar como emisores de fluorescencia para cuantificar los productos de PCR. En el presente trabajo se utilizó el SYBR Green, que es un fluoróforo que se une al ADN de doble cadena emitiendo mucha más fluorescencia que cuando está disuelto en el medio. El SYBR Green no se une a secuencias específicas, por lo que hay que analizar las curvas de disociación de los productos de PCR para comprobar que sólo se amplifica una secuencia (Wong and Medrano, 2005;Valasek and Repa, 2005).

Las ventajas de la PCR a tiempo real sobre otras técnicas de cuantificación de ácidos nucleicos son su alta sensibilidad, su bajo coeficiente de variación, su amplio rango de cuantificación y su especificidad al utilizarse cebadores específicos para la secuencia que se quiere amplificar (Ding and Cantor, 2004;Wong and Medrano, 2005;Valasek and Repa, 2005). Algunas de las desventajas son que al tener que partir de ARN, el riesgo de degradación y contaminación es elevado. Para evitar esto, se recomienda llevar a cabo el paso de ARN a ADNc (mediante transcripción inversa) en una reacción previa, para minimizar la manipulación del ARN, teniendo en cuenta que las diferencias en la eficacia del proceso de transcripción inversa introducen variabilidad en los resultados posteriores de la RT-PCR (Ginzinger, 2002;Huggett et al., 2005;Bustin et al., 2005;Wong and Medrano, 2005;Valasek and Repa, 2005). En la presente Tesis se realizó el paso de ARN a ADNc en un paso previo, manteniéndose constantes las condiciones de la reacción en todas las muestras para minimizar la variabilidad.

2. Acerca de los resultados:

Los resultados más relevantes obtenidos en la presente Tesis doctoral son los siguientes:

- La perfusión local de NMDA y AMPA produce un aumento en la concentración extracelular de dopamina y GABA, y un aumento de actividad motora. Estos efectos no se ven modificados por el enriquecimiento ambiental.

- La corticosterona potencia los efectos de los agonistas glutamatérgicos en los animales jóvenes de manera selectiva según la dosis: la dosis de 50ng/ml potencia el efecto del NMDA sobre la liberación de dopamina, mientras que la dosis de 600ng/ml potencia el efecto del AMPA sobre la liberación de GABA y la actividad motora. Estos efectos no se modifican por el enriquecimiento ambiental, salvo la reducción de la potenciación de la actividad motora inducida por AMPA.
- El envejecimiento no modifica la acción del NMDA sobre la liberación de dopamina y GABA. La perfusión de corticosterona 600ng/ml no modifica los efectos de la perfusión de NMDA en animales de 15 ni 27 meses de edad. El enriquecimiento ambiental no modifica los efectos de la perfusión de NMDA ni de NMDA junto con corticosterona 600ng/ml en estos grupos de edad.
- El enriquecimiento ambiental y el envejecimiento no modifican la expresión de las diferentes subunidades de los receptores NMDA y AMPA en el núcleo accumbens, aunque se observa una tendencia al aumento en los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental. Tampoco se modifica la expresión de los receptores de glucocorticoides. Sin embargo, la expresión de los receptores de mineralocorticoides parece aumentar con la edad, aunque no se observa un efecto del enriquecimiento ambiental.
- En el estriado, la expresión de las subunidades de NMDA no se ve afectada por el enriquecimiento ambiental ni por el envejecimiento, si bien la expresión de las subunidades AMPA aumenta con el enriquecimiento ambiental y tiende a aumentar con el envejecimiento. La expresión de receptores de glucocorticoides en el estriado no se ve afectada por el enriquecimiento ambiental ni por el envejecimiento.
- La actividad motora espontánea horizontal y vertical de los animales se reduce tanto por el enriquecimiento ambiental como por el envejecimiento.

La discusión de estos resultados se ha subdividido en los apartados que siguen.

2.1. Sobre los efectos del enriquecimiento ambiental en animales jóvenes:

Sobre las acciones de los agonistas NMDA y AMPA:

La perfusión local de NMDA y AMPA en el núcleo accumbens produce un aumento en la concentración extracelular de dopamina. Estos resultados concuerdan

con los descritos anteriormente en nuestro propio laboratorio para el núcleo accumbens (Segovia and Mora, 2005; Mora et al., 2007) y con varios trabajos de diversos grupos que muestran que la activación de receptores ionotrópicos de glutamato producen un aumento de dopamina (Imperato et al., 1990; Boldry et al., 1991; Youngren et al., 1993; Doherty and Gratton, 1997; Cano-Cebrián et al., 2003; Ikeda et al., 2003). Sin embargo, el papel del glutamato sobre la liberación de dopamina es controvertido, ya que junto a este efecto estimulador también se ha descrito un efecto inhibitorio (Taber et al., 1996; Morari et al., 1998; David et al., 2004). Se han propuesto dos mecanismos para explicar estos efectos de los agonistas glutamatérgicos (Mora et al., 2008). El primero consistiría en una regulación directa presináptica de la liberación de dopamina en las terminaciones dopaminérgicas que llegan a accumbens (Taepavarapruk et al., 2000). Esta hipótesis está sustentada por datos anatómicos, que muestran la presencia de receptores NMDA y AMPA en las terminaciones dopaminérgicas de accumbens (French et al., 1985; Gracy and Pickel, 1996; Zavitsanou et al., 1996; Tarazi et al., 1998) y por datos funcionales que han descrito que la perfusión local de antagonistas NMDA y AMPA producen un bloqueo de la liberación de dopamina (Imperato et al., 1990; Taepavarapruk et al., 2000). El segundo mecanismo implica un control indirecto de la liberación de dopamina en accumbens, implicando a otras áreas cerebrales como área tegmental ventral, corteza prefrontal o hipocampo. Se ha descrito que las aferencias glutamatérgicas que llegan al núcleo accumbens desde corteza prefrontal activarían las neuronas de proyección que envían información al área tegmental ventral, produciéndose una disminución en la liberación de dopamina (Sesack and Carr, 2002; Sesack et al., 2003; Yang and Chen, 2005). Por otro lado, las aferencias glutamatérgicas al núcleo accumbens que provienen del hipocampo activarían neuronas de proyección GABAérgicas que inhibirían a neuronas GABAérgicas del pálido ventral, que, a su vez, inhibirían tónicamente a las neuronas dopaminérgicas de área tegmental ventral (Floresco et al., 2001; Floresco et al., 2003; Lodge and Grace, 2005). Hay que tener en cuenta que el control presináptico y el control mediado por circuitos más complejos no son excluyentes, y la concentración final de dopamina en el núcleo accumbens será la resultante de una integración entre todas las vías posibles.

La perfusión de NMDA y AMPA también produce un aumento en la concentración extracelular de GABA. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Segovia et al., 1999; Segovia and Mora, 2005; Mora et al., 2008). Al igual que se ha indicado para la concentración extracelular de dopamina, el efecto de los agonistas glutamatérgicos sobre la

concentración de GABA podría ser directo, a través de receptores localizados en el soma de las interneuronas GABAérgicas existentes en accumbens o en las propias neuronas espinosas de tamaño medio que envían colaterales locales (Smith and Bolam, 1990;de Rover et al., 2002). Así mismo, los astrocitos también tienen receptores glutamatérgicos (Gracy and Pickel, 1996;Steinhäuser and Gallo, 1996;Gallo and Ghiani, 2000), y son capaces de liberar GABA (Attwell et al., 1993;del Arco et al., 2003). El aumento de la concentración extracelular de GABA se produce con cierto retraso en comparación con la dopamina, lo que sugiere una integración entre la liberación sináptica y la producida por parte de los astrocitos, y también a un papel inhibitorio de la dopamina sobre el GABA (Girault et al., 1986;Harsing and Zigmond, 1997). Tal y como se ha resaltado para la dopamina, estos mecanismos no son excluyentes, por lo que la concentración extracelular final de GABA sería la resultante de una integración de todos ellos.

Finalmente, la perfusión local de NMDA y AMPA produjo un incremento de la actividad motora de los animales. El núcleo accumbens es un área de gran importancia en el control motor, ya que se ha descrito como un núcleo de integración límbico-motora (Mogenson et al., 1980). La acción potenciadora de los agonistas glutamatérgicos en este área concreta sobre la actividad motora de los animales ha sido ampliamente descrita (Imperato et al., 1990;Boldry et al., 1991;Ikeda et al., 2003;David et al., 2004). Esta acción de los agonistas glutamatérgicos estaría además en consonancia con el hecho de que la activación de las aferencias glutamatérgicas al núcleo accumbens incrementan la actividad locomotora (Brudzynski and Gibson, 1997;Taepavarapruk et al., 2000;Zornoza-Sabina et al., 2005).

Como se describe en la sección de resultados, el enriquecimiento ambiental no modifica la acción que los agonistas glutamatérgicos NMDA y AMPA ejercen sobre la liberación de dopamina y GABA en el núcleo accumbens, ni sobre la actividad motora. Este resultado contrasta con diferentes estudios que muestran un efecto del enriquecimiento ambiental sobre el sistema glutamatérgico. Así, se ha descrito que el enriquecimiento ambiental produce una potenciación de la transmisión sináptica excitadora en hipocampo y una mayor fuerza sináptica en la vía perforante (Foster et al., 1996;van Praag et al., 2000). También se ha observado que los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental muestran mayores niveles de glutamato en corteza entorrinal (Wood et al., 2005), y menor expresión del transportador de glutamato EAAC1 (Andin et al., 2007). El efecto del enriquecimiento sobre la expresión de receptores glutamatérgicos es controvertido, ya que el efecto

sobre la expresión de los diferentes receptores depende del área cerebral específica de estudio. A este respecto, se ha descrito que el enriquecimiento ambiental produce un aumento de la expresión de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA en el prosencéfalo (Tang et al., 2001;Bredy et al., 2004), así como una disminución de la expresión de NR1 en el núcleo accumbens estimado mediante inmunohistoquímica (Wood et al., 2005). En cuanto a los receptores AMPA, hay estudios que describen tanto un aumento de la unión de $[H]^3$ -AMPA como una disminución en hipocampo (Gagné et al., 1998;Bredy et al., 2003). También se ha observado un aumento en la expresión de las subunidades GluR1, GluR2 y GluR4 en hipocampo y prosencéfalo (Tang et al., 2001;Mlynarik et al., 2004;Naka et al., 2005). El enriquecimiento también aumenta el número de receptores metabotrópicos en corteza prefrontal dorsal (Melendez et al., 2004).

En base a todos estos estudios, se plantea en esta Tesis Doctoral la hipótesis de que el enriquecimiento ambiental modifica la liberación de dopamina y GABA producidos por la activación de receptores NMDA y AMPA. La ausencia de efectos del enriquecimiento ambiental sobre la liberación de dopamina y GABA podría explicarse por la existencia de una sensibilidad diferencial de los sistemas glutamatérgicos al enriquecimiento ambiental. De acuerdo con esto, y como se ha descrito anteriormente, la mayoría de los trabajos que han encontrado resultados positivos se han centrado en el estudio del hipocampo y otras áreas corticales. De hecho, en la presente Tesis Doctoral no se ha observado ningún efecto significativo del enriquecimiento ambiental sobre la expresión de subunidades de los receptores NMDA y AMPA en el núcleo accumbens, lo cual estaría en consonancia con la ausencia de cambios en la liberación de dopamina y GABA inducida por estos agonistas. Es interesante además el hecho de que en el estriado sí se observaron cambios significativos en la expresión de receptores glutamatérgicos (AMPA), lo que refuerza la hipótesis de un efecto diferencial del enriquecimiento ambiental en las distintas áreas cerebrales. Finalmente, en un estudio previo del laboratorio se describió que, si bien la liberación de dopamina inducida por potasio en el núcleo accumbens estaba potenciada en los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental, la liberación de dopamina inducida por AMPA no se modificó significativamente en esta misma área cerebral (Segovia et al., 2010). Este último resultado sugiere además que el efecto modulador del enriquecimiento ambiental sobre la actividad de los diferentes sistemas neurotransmisores es específico no sólo del área cerebral, sino también de los estímulos y paradigmas experimentales utilizados.

Sobre las acciones de la corticosterona:

Como se describe en la sección de resultados de la presente Tesis Doctoral, la perfusión de corticosterona potenció los efectos de los agonistas glutamatérgicos en el núcleo accumbens de animales jóvenes. Dada la dinámica temporal del efecto de la corticosterona, éste no parece estar mediado por la activación de receptores de glucocorticoides citoplasmáticos, los cuales, una vez activados, se translocan al núcleo y regulan la expresión de diferentes genes (de Kloet, 2000;McEwen, 2000;de Kloet et al., 2005;Joëls et al., 2008). También se ha descrito que, además de estos efectos genómicos, la corticosterona puede ejercer acciones rápidas mediadas por receptores de membrana (Joëls et al., 2008). Entre estos efectos se han observado alteraciones en la excitabilidad neuronal en hipocampo, cambios en la liberación de neurotransmisores y efectos conductuales (Sandi et al., 1996;Venero and Borrell, 1999;Wiegert et al., 2006;Herbert et al., 2006;Liu et al., 2007;Joëls et al., 2008). En concreto, se ha descrito que la corticosterona aumenta la liberación de glutamato en el hipocampo (Venero and Borrell, 1999;Karst et al., 2005) y la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Piazza et al., 1996;Tye et al., 2009). También se ha descrito que la corticosterona potencia las respuestas a NMDA que se producen en el área tegmental ventral (Cho and Little, 1999). Por tanto, la corticosterona podría estar actuando sobre la interacción entre los neurotransmisores glutamato, dopamina y GABA en el núcleo accumbens a través de receptores de membrana. Todavía no ha sido descrita la naturaleza de estos receptores de membrana, pero se cree que no deben ser muy diferentes de los citoplasmáticos (Joëls et al., 2008).

Los efectos de la corticosterona sobre las acciones de los agonistas glutamatérgicos parecen depender de la dosis utilizada y del neurotransmisor estudiado. Así, la dosis de corticosterona de 50ng/ml parece potenciar el efecto de la perfusión de NMDA sobre la concentración extracelular de dopamina. Se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales la corticosterona puede modular la liberación de dopamina, entre ellos un aumento en la síntesis de dopamina, una disminución de la actividad de la monoaminoxidasa y una disminución de la recaptura de dopamina (Rouge-Pont et al., 1998). Así mismo, la corticosterona podría potenciar la respuesta a NMDA al igual que ocurre en el área tegmental ventral (Cho and Little, 1999), o aumentar el reclutamiento de receptores NMDA a la superficie sináptica como ocurre en corteza prefrontal (Yuen et al., 2010). La dosis de corticosterona de 600ng/ml, por otro lado, parece potenciar (aunque de manera no estadísticamente significativa) el efecto de la perfusión de AMPA sobre la

concentración extracelular de GABA. Los glucocorticoides pueden potenciar la liberación sináptica de GABA mediante la liberación de óxido nítrico que actuaría como un mensajero retrógrado (Di et al., 2009). Además, se ha descrito que la corticosterona aumenta el reclutamiento de receptores AMPA que contienen la subunidad GluR2 a la superficie sináptica en hipocampo y corteza prefrontal (Groc et al., 2008; Conboy and Sandi, 2009; Yuen et al., 2010). Como conclusión, si bien se han propuesto diferentes mecanismos a través de los cuales la corticosterona puede modular la liberación de neurotransmisores a través de receptores de membrana, son necesarios más experimentos para discernir cómo lleva a cabo la modulación de la interacción glutamato-dopamina-GABA en nuestro modelo experimental.

La corticosterona 50ng/ml no modifica el efecto de la perfusión de NMDA sobre la actividad motora, a pesar de que la liberación de dopamina se vea potenciada. Este resultado es sorprendente teniendo en cuenta el papel que las aferencias dopaminérgicas que recibe el núcleo accumbens desde área tegmental ventral parecen jugar en el control de la actividad motora (Mogenson et al., 1980; Imperato et al., 1990; Boldry et al., 1991; Wu and Brudzynski, 1995; Brudzynski and Gibson, 1997; Taepavarapruk et al., 2000; Ikemoto, 2002; Ikeda et al., 2003; David et al., 2004; Zornoza-Sabina et al., 2005). Por otro lado, la potenciación de la liberación de GABA inducida por AMPA sí se acompaña de un aumento de la actividad motora. Este resultado estaría en consonancia con la relevancia de los receptores AMPA en la transmisión glutamatérgica y, por lo tanto, en la función del núcleo accumbens (David et al., 2004; Mora et al., 2008).

Una de las hipótesis de esta Tesis Doctoral es que el enriquecimiento ambiental podría modificar los efectos de la corticosterona, ya que el mantenimiento de los animales en condiciones de enriquecimiento ambiental modifica sus respuestas ante situaciones y estímulos estresantes. Así, se ha descrito que los animales mantenidos en estas condiciones muestran una menor respuesta ante ambientes novedosos, lo que sugiere que tienen un eje hipotálamo-hipófisis-adrenal más adaptativo que los animales control (Larsson et al., 2002; Mlynarik et al., 2004; Fox et al., 2006; Segovia et al., 2009). Además, estos animales muestran una menor liberación de corticosterona durante y tras un estímulo estresante (Belz et al., 2003; Marashi et al., 2003; Mlynarik et al., 2004; Moncek et al., 2004; Garrido et al., 2008; Garrido, 2010), y una mayor expresión de receptores de glucocorticoides que los animales mantenidos en condiciones control (Gagné et al., 1998; Mohammed et al., 2002; Larsson et al., 2002). A pesar de todos los cambios descritos previamente, en los resultados obtenidos en la

presente Tesis Doctoral el enriquecimiento ambiental no modifica el efecto de la corticosterona sobre la interacción de neurotransmisores en el núcleo accumbens. Sin embargo, la falta de efecto de las condiciones ambientales sobre la expresión de los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides podría explicar este efecto negativo. Este último resultado refuerza además el efecto selectivo que el enriquecimiento ambiental parece ejercer sobre diferentes áreas cerebrales. Es interesante, sin embargo, el hecho de que la potenciación que la dosis de corticosterona de 600ng/ml produce sobre la actividad motora inducida por AMPA sí se redujo en los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental. Dado que la dosis de 600ng/ml se utilizó porque permite un incremento de corticosterona en el tejido similar al que se produce durante situaciones estresantes (Venero and Borrell, 1999), este resultado podría ser importante para explicar la reducción de la respuesta motora a la novedad que muestran los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental (ver más abajo). La ausencia de cambios en la expresión de receptores de glucocorticoides sugiere, además, que este efecto del enriquecimiento ambiental se produce modificando las vías activadas por estos receptores. En particular, las acciones rápidas de los glucocorticoides podrían estar mediadas por alteraciones en las propiedades de la membrana, en las propiedades de los receptores de neurotransmisores o por la activación de vías de segundos mensajeros asociados a proteínas G (Sandi et al., 1996;Herbert et al., 2006;Joëls et al., 2008) .

Como se describe en la sección de resultados, los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental muestran una menor respuesta locomotora ante ambientes novedosos. Este resultado ha sido descrito en numerosos estudios y sugiere que el enriquecimiento ambiental favorece una adaptación emocional más rápida ante situaciones nuevas (Fox et al., 2006;Segovia et al., 2009). Por otro lado, los animales mantenidos en estas condiciones muestran una mejor estrategia exploratoria, lo que les permite extraer información de manera más eficiente, reduciendo así el tiempo de habituación (Zimmermann et al., 2001;Schrijver et al., 2002;Larsson et al., 2002). Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental muestran una menor actividad horizontal total en comparación con los animales control, lo que correspondería a una habituación más rápida. Así mismo, la mayor actividad motora vertical durante los 5 primeros minutos que presentan los animales mantenidos en enriquecimiento, indicaría una mayor actividad exploratoria inicial en comparación con los animales control. En resumen, los animales del grupo de enriquecimiento ambiental de la presente Tesis Doctoral muestran el perfil de

respuesta esperado ante situaciones novedosas, sugiriendo que se han producido en estos animales diferentes cambios en los sistemas neurobiológicos responsables de la actividad motora y la integración emocional como el núcleo accumbens (Mogenson et al., 1980). Los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren que estos cambios no incluyen la modificación de las acciones de la corticosterona sobre la interacción de neurotransmisores. Sin embargo, la reducción del efecto de la corticosterona sobre la actividad motora inducida por AMPA sí podría contribuir al cambio en la respuesta ante la novedad que muestran los animales mantenidos en enriquecimiento ambiental.

2.2. Sobre el efecto del envejecimiento sobre las acciones de la corticosterona:

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral fue estudiar si el envejecimiento modificaba los efectos de la corticosterona sobre la interacción glutamato-dopamina-GABA, y si el enriquecimiento ambiental cambiaba estas posibles acciones del envejecimiento. Para este estudio se investigó en animales de 15 y 27 meses de edad el efecto de la corticosterona 600ng/ml, que permite un incremento de corticosterona en el tejido similar al alcanzado en el cerebro tras un estrés agudo moderado (Venero and Borrell, 1999). Es interesante destacar el hecho de que se ha descrito que los animales viejos tardan más en recuperar sus niveles basales de corticosterona tras un estímulo estresante (Sapolsky et al., 1983; Lorens et al., 1990; van Eekelen et al., 1992; Segar et al., 2009), lo que podría ser debido a un déficit en la retroalimentación negativa que ejercen los propios glucocorticoides en áreas del cerebro como corteza prefrontal e hipocampo (Sapolsky et al., 1986). Sin embargo, el objetivo del estudio era investigar si las acciones de la corticosterona mediadas por sus receptores podrían cambiar durante el envejecimiento, independientemente de los niveles fisiológicos de corticosterona que se alcanzan durante el estrés. A este respecto, se ha observado que la densidad y la expresión del ARNm de los receptores de glucocorticoides en áreas tan importantes para el control de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal como son el propio hipotálamo, el hipocampo y la corteza cerebral se ven reducidos con la edad (Reul et al., 1988; Meaney et al., 1992; van Eekelen et al., 1992; Morano et al., 1994; Hassan et al., 1999; Bizon et al., 2001; Mizoguchi et al., 2009). Además se sabe que la respuesta neuroquímica ante situaciones de estrés se ve modificada por el envejecimiento. En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que el aumento de dopamina que se produce en corteza prefrontal en respuesta a estrés se ve reducido en animales viejos (del Arco et al., 2001; Segovia et al., 2008a). Por todo esto, se planteó la hipótesis de que el envejecimiento puede modificar los efectos de los

glucocorticoides sobre la interacción glutamato-dopamina-GABA en el núcleo accumbens.

En la presente Tesis Doctoral se observa que, en los animales de 15 y 27 meses de edad, la dosis de corticosterona de 600ng/ml no tuvo ningún efecto sobre la liberación de dopamina y GABA inducida por NMDA. Por tanto, parece que la corticosterona no modifica la interacción de los neurotransmisores glutamato y dopamina, ni glutamato y GABA durante el envejecimiento. Hay que considerar, sin embargo, que la misma dosis de corticosterona tampoco modificó las acciones del NMDA en animales jóvenes. A pesar de esto, y dado que se han descrito cambios asociados a la edad en la expresión de receptores de glucocorticoides en diferentes áreas cerebrales, la corticosterona podría haber modificado las acciones del NMDA en animales de edad media o envejecidos. En consonancia con la ausencia de efecto de la corticosterona, la expresión de receptores de glucocorticoides y de mineralocorticoides no cambia en el núcleo accumbens en los animales de 15 y 27 meses de edad, al compararlos con los animales de 6 meses. Estos últimos resultados sugieren, además, que otras áreas más relacionadas con el control del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, como hipocampo y corteza prefrontal, son más sensibles a los efectos negativos del envejecimiento (Sapolsky et al., 2000; Garrido, 2011). Por otro lado, los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que, en los animales de edad media y viejos mantenidos en enriquecimiento ambiental, la corticosterona no modifica la interacción de los neurotransmisores glutamato, dopamina y GABA en el núcleo accumbens. El enriquecimiento ambiental tampoco modifica la expresión de receptores de glucocorticoides en ninguno de los grupos de edad. Estos resultados estarían en consonancia con la ausencia de cambios observados en los animales jóvenes mantenidos en enriquecimiento ambiental, y sugieren que los efectos del enriquecimiento ambiental atenuando la reactividad frente al estrés estarían predominantemente mediados por la modulación de la liberación de corticosterona y de diferentes neurotransmisores en áreas específicas del cerebro (Segovia et al., 2009).

Finalmente, aunque no es uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral, los resultados sugieren que el efecto del NMDA sobre la dopamina y el GABA en el núcleo accumbens no parece verse modificado por el envejecimiento. Estos resultados contrastan con estudios previos de nuestro laboratorio, que han descrito que el aumento de dopamina inducido por glutamato endógeno en el núcleo accumbens disminuye con la edad (Segovia et al., 1999). Así mismo, se ha observado que la activación de diferentes receptores glutamatérgicos en el núcleo accumbens produce

incrementos tanto de dopamina como de GABA, y que ambos incrementos se reducen con la edad (Segovia and Mora, 2005). Sin embargo, en consonancia con los resultados de los experimentos de microdiálisis de esta Tesis Doctoral, tampoco se observan cambios importantes en la expresión de subunidades de los receptores NMDA (ni AMPA) en ambas condiciones experimentales en el núcleo accumbens, salvo un efecto del enriquecimiento ambiental en animales de 15 meses para algunas de las subunidades estudiadas. También se observan efectos del enriquecimiento ambiental en el estriado, tanto para animales de 15 meses como para animales de 27 meses, fundamentalmente en la expresión de subunidades del receptor AMPA. Estos resultados de expresión de receptores además contrastan con numerosos estudios que describen una reducción de la densidad de receptores NMDA y AMPA en áreas como la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado durante el proceso de envejecimiento (Magnusson, 1998;Segovia et al., 2001), si bien las diferencias se pueden explicar por las diferentes metodologías utilizadas. No existen, por otro lado, estudios sobre el efecto del enriquecimiento ambiental sobre la expresión o densidad de receptores de neurotransmisores a lo largo del envejecimiento. El conjunto de estos resultados sugiere que los efectos del envejecimiento y del enriquecimiento ambiental son específicos de las distintas áreas cerebrales, neurotransmisores e, incluso para un mismo neurotransmisor, de sus diferentes receptores. Resultados similares se han observado en los efectos del envejecimiento y del enriquecimiento ambiental sobre otros parámetros neuroquímicos (Segovia et al., 2001;Segovia et al., 2009). Por último, es interesante el hecho de que los animales de los diferentes grupos experimentales utilizados en esta Tesis Doctoral muestran uno de los cambios más característicos del envejecimiento, como es la reducción de la actividad motora espontánea (Nyakas et al., 1992;Huang et al., 1995;Yurek et al., 1998;Zimmermann et al., 2001;Segovia et al., 2008a;Segovia et al., 2008b). El núcleo accumbens es un área muy importante en el control de la actividad motora, por lo que resulta sorprendente no encontrar cambios neuroquímicos ni de expresión de receptores que expliquen las alteraciones en actividad motora espontánea que se observan con la edad. Sin embargo, no podemos olvidar que el núcleo accumbens es un área de integración que recibe información de otras áreas cerebrales como son la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala. Estas áreas podrían sufrir cambios con el envejecimiento que produjeran, en último término, las alteraciones de la actividad motora espontánea que se observan en los animales viejos (Mora et al., 2008).

CONCLUSIONES

1. La corticosterona modula la interacción de neurotransmisores en el núcleo accumbens de animales jóvenes, y dicho efecto depende de la dosis y del neurotransmisor estudiado.

2. El enriquecimiento ambiental no modifica el papel modulador de la corticosterona sobre la interacción de neurotransmisores en el núcleo accumbens.

3. La corticosterona no modifica la interacción de neurotransmisores mediada por receptores NMDA en el núcleo accumbens durante el proceso de envejecimiento.

4. El enriquecimiento ambiental y el envejecimiento modifican la expresión de receptores de manera específica según el área cerebral y el receptor estudiado.

5. El enriquecimiento ambiental y el envejecimiento reducen la actividad motora espontánea de los animales en respuesta a ambientes novedosos.

6. La reducción que el enriquecimiento ambiental produce sobre la respuesta al estrés no parece depender de cambios en la interacción entre la corticosterona y los diferentes sistemas neurotransmisores en el núcleo accumbens.

BIBLIOGRAFÍA

Abercrombie ED, Keefe KA, Daniel SD, Zigmond MJ (1989) Differential effects of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem* 52:1655-1658.

Allison LA, Mayer GN, Shoup RE (1984) O-phthalaldehyde derivatives of amines for high speed liquid chromatography electrochemistry. *Ann Chem* 56:1089-1096.

Anderson GM (1993) High performance liquid chromatographic analysis of monoamines and metabolites in body fluids. In: High performance liquid chromatography in neuroscience research (Holman RB, Cross AJ, Joseph MH, eds), pp 55-88. Chichester (England): John Wiley&Sons,Ltd.

Andin J, Hallbeck M, Mohammed AH, Marcusson J (2007) Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus. *Brain Res* 1174:18-27.

Antonelli T, Ferioli V, Lo Gallo G, Tomasini MC, Fernández M, O'Connor WT, Glennon JC, Tanganelli S, Ferraro L (2000) Differential effects of acute and short-term lithium administration on dialysate glutamate and GABA levels in the frontal cortex of the conscious rat. *Synapse* 38:355-362.

Arnsten AFT (1998) Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends Cognitive Sci* 2:436-447.

Arranz L, de Castro NM, Baeza I, Maté I, Viveros MP, de la Fuente M (2010) Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res* 13:415-428.

Artola A, von Frijtag JC, Fermont PCJ, Gispen WH, Schrama LH, Kamal A, Spruijt BM (2006) Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 23:261-272.

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

Bardo MT, Klebaur J, Valone J, Deaton C (2001) Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology* 155:278-284.

Belz EE, Kennell JS, Czambell RK, Rubin RT, Rhodes ME (2003) Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 76:481-486.

Benveniste H (1989) Brain microdialysis. *J Neurochem* 52:1667-1679.

Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M (2003) Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci* 23:10999-11007.

Bianchi L, Galeffi F, Bartolini S, Bolam JP, Della Corte L (1996) The evoked release of endogenous amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. A

dual microdialysis study in the freely moving rat. In: *Monitoring molecules in neurosciences* (González-Mora JL, Borges R, Mas M, eds), pp 176-177. La Laguna: University of La Laguna.

Biegon A, Duvdevani R, Greenberger V, Segal M (1988) Aging and brain cholinergic muscarinic receptors: an autoradiographic study in the rat. *J Neurochem* 51:1381-1385.

Bimonte HA, Nelson ME, Granholm AC (2003) Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiol Aging* 24:37-48.

Bizon JL, Helm KA, Han JS, Chun HJ, Pucilowska J, Lund PK, Gallagher M (2001) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans rats. *Eur J Neurosci* 14:1739-1751.

Boldry RC, Willins DL, Wallace LJ, Uretsky NJ (1991) The role of endogenous dopamine in the hypermotility response to intra-accumbens AMPA. *Brain Res* 559:100-108.

Bowling SL, Rowlett JK, Bardo MT (1993) The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. *Neuropharmacology* 32:885-893.

Bredy TW, Humpartzoomian RA, Cain DP, Meaney MJ (2003) Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment. *Neuroscience* 118:571-576.

Bredy TW, Zhang TY, Grant RJ, Diorio J, Meaney MJ (2004) Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur J Neurosci* 20:1355-1362.

Brudzynski SM, Gibson CJ (1997) Release of dopamine in the nucleus accumbens caused by stimulation of the subiculum in freely moving rats. *Brain Res Bull* 42:303-308.

Bustin S, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005) Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34:597-601.

Cameron HA, Gould E (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61:203-209.

Cano-Cebrián MJ, Zornoza-Sabina T, Guerri C, Polache A, Granero L (2003) Local acamprosate modulates dopamine release in the rat nucleus accumbens through NMDA receptors: an in vivo microdialysis study. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367:119-125.

Carboni E, Silvagni A (2004) Dopamine reuptake by norepinephrine neurons: exception or rule? *Crit Rev Neurobiol* 16:121-128.

Carroll RC, Zukin RS (2002) NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* 25:571-577.

Chauvet C, Lardeux V, Goldberg SR, Jaber M, Solinas M (2009) Environmental Enrichment Reduces Cocaine Seeking and Reinstatement Induced by Cues and Stress but Not by Cocaine. *Neuropsychopharmacology* 34:2767-2778.

Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang T-S, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J (2005) Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *The Journal of Neuroscience* 25:8209-8216.

Cho K, Little HJ (1999) Effects of corticosterone on excitatory amino acid responses in dopamine-sensitive neurons in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 88:837-845.

Conboy L, Sandi C (2009) Stress at Learning Facilitates Memory Formation by Regulating AMPA Receptor Trafficking Through a Glucocorticoid Action. *Neuropsychopharmacology* 35:674-685.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.

Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 255:re16.

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins RJ (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28:771-784.

Dalley JW, Fryer TD, Brichard L, Robinson DS, Theobald DE, Lääne K, Peña Y, Murphy ER, Shah Y, Probst K, Abakumova I, Aigbirhio I, Richards HK, Hong Y, Baron JC, Everitt BJ, Robbins RJ (2007) Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science* 315:1267-1270.

David HN, Sissaoui K, Abraini JH (2004) Modulation of the locomotor responses induced by D1-like and D2-like dopamine receptor agonists and D-amphetamine by NMDA and non-NMDA glutamate receptor agonists and antagonists in the core of the rat nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 46:179-191.

David HN, Ansseau M, Abraini JH (2005) Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. *Brain Res Rev* 50:336-360.

Day JC, Kornecook TJ, Quirion R (2001) Application of *in vivo* microdialysis to the study of cholinergic systems. *Methods* 23:21-39.

de Groot L, Linthorst ACE (2007) Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus. *Neuroscience* 148:794-805.

de Kloet ER (2000) Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* 405:187-198.

de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.

de Rover M, Lodder JC, Kits KS, Schoffeleers AN, Brussaard AB (2002) Cholinergic modulation of nucleus accumbens medium spiny neurons. *Eur J Neurosci* 16:2279-2290.

- Decker MW (1987) The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res Rev* 12:423-438.
- del Arco A, Mora F (2001) Dopamine release in the prefrontal cortex during stress is reduced by the local activation of glutamate receptors. *Brain Res Bull* 56:125-130.
- del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, De Blas M, García-Verdugo JM, Mora F (2007a) Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J Neural Transm* 114:43-48.
- del Arco A, Segovia G, Fuxe K, Mora F (2003) Changes of dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem* 85:23-33.
- del Arco A, Segovia G, Garrido P, De Blas M, Mora F (2007b) Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res* 176:267-273.
- del Arco A, Segovia G, Mora F (2001) Dopamine release during stress in the prefrontal cortex of the rat decreases with age. *NeuroReport* 12:4019-4022.
- del Arco A, Segovia G, de Blas M, Garrido P, Acuña-Castroviejo D, Pamplona R, Mora F (2011) Prefrontal cortex, caloric restriction and stress during aging: Studies on dopamine and acetylcholine release, BDNF and working memory. *Behav Brain Res* 216:136-145.
- Der-Avakian A, Bland ST, Schmid MJ, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF (2006) The role of glucocorticoids in the uncontrollable stress-induced potentiation of nucleus accumbens shell dopamine and conditioned place preference responses to morphine. *Psychoneuroendocrinology* 31:653-663.
- Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8:101-113.
- Di Chiara G (1990) In vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci* 11:116-121.
- Di S, Maxson MM, Franco A, Tasker JG (2009) Glucocorticoids Regulate Glutamate and GABA Synapse-Specific Retrograde Transmission via Divergent Nongenomic Signaling Pathways. *J Neurosci* 29:393-401.
- Ding C, Cantor CR (2004) Quantitative analysis of nucleic acids- the last few years of progress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37:1-10.
- Doherty M, Gratton A (2007) Differential involvement of ventral tegmental GABA_A and GABA_B receptors in the regulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress. *Brain Res* 1150:62-68.
- Doherty MD, Gratton A (1997) NMDA receptors in nucleus accumbens modulate stress-induced dopamine release in nucleus accumbens and ventral tegmental area. *Synapse* 26:225-234.
- Doherty MD, Gratton A (1996) Medial prefrontal cortical D1 receptor modulation of the meso-accumbens dopamine response to stress: an electrochemical study in freely-behaving rats. *Brain Res* 715:86-97.

Duffy SN, Craddock KJ, Abel T, Nguyen PV (2001) Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Mem* 8:26-34.

Feenstra MGP, Botterblom MHA, van Uum JFM (1998) Local activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the handling-induced increased release of dopamine in the nucleus accumbens but not that of dopamine or noradrenaline in the prefrontal cortex: comparison with inhibition of ionotropic receptors. *J Neurochem* 70:1104-1113.

Fernández CI, Collazo J, Bauza Y, Castellanos MR, López A (2004) Environmental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rat. *Ann NY Acad Sci* 1019:53-57.

Fernández-Espejo E (2000) ¿Cómo funciona el nucleus accumbens? *Rev Neurol* 30:845-849.

Finch CE (1993) Neuron atrophy during aging: programmed or sporadic. *Trends Neurosci* 16:104-110.

Finlay JM, Zigmond MJ (1997) The effects of stress on central dopaminergic neurons: possible clinical implications. *Neurochem Res* 22:1387-1394.

Floresco SB, Todd CL, Grace AA (2001) Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci* 21:4915-4922.

Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6:968-973.

Foster TC, Gagné J, Massicotte G (1996) Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Res* 736:243-250.

Fox C, Merali Z, Harrison C (2006) Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res* 175:1-8.

French ED, Pilapil C, Quirion R (1985) Phencyclidine binding sites in the nucleus accumbens and phencyclidine-induced hyperactivity are decreased following lesions of the mesolimbic dopamine system. *Eur J Pharmacol* 116:1-9.

Frick KM, Fernandez SM (2003) Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* 24:615-626.

Friedemann MN, Gerhardt GA (1992) Regional effects of aging on dopaminergic function in the Fisher-344 rat. *Neurobiol Aging* 13:325-332.

Fujiyama F, Kuramoto E, Okamoto K, Hioki H, Furuta T, Zhou L, Nomura S, Kaneko T (2004) Presynaptic localization of an AMPA-type glutamate receptor in corticostriatal and thalamostriatal axon terminals. *Eur J Neurosci* 20:3322-3330.

Gagné J, Gélinas S, Martinoli MG, Foster TC, Ohayon M, Thompson RF, Baudry M, Massicotte G (1998) AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. *Brain Res* 799:16-25.

Gallo V, Ghiani CA (2000) Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci* 21:252-345.

Garrido P (2010) Enriquecimiento ambiental, corteza prefrontal y envejecimiento cerebral: efectos neuroquímicos y conductuales del estrés. Universidad Complutense de Madrid.

Garrido P (2011) Aging and stress: past hypotheses, present approaches and perspectives. *Aging and Disease* 2:80-99.

Garrido P, De Blas M, del Arco A, Segovia G, Mora F (2010) Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the hippocampus and the prefrontal cortex of the awake rat. *Neurobiol Aging* doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.015.

Garrido P, De Blas M, del Arco A, Segovia G, Mora F (2008) Environmental enrichment suppresses dopamine and corticosterone increases produced by acute stress in the prefrontal cortex of the rat. *FENS Abstr* 4:114.8.

Gerhardt GA, Maloney RE (1999) Microdialysis studies of basal levels and stimulus-evoked overflow of dopamine and metabolites in the striatum of young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res* 816:68-77.

Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30:503-512.

Girault JA, Spampinato U, Glowinski J, Besson MJ (1986) In vivo release of [³H]γ-aminobutyric acid in the rat neostriatum-II: Opposing effects of D₁ and D₂ dopamine receptor stimulation in the dorsal caudate putamen. *Neuroscience* 19:1109-1117.

Gracy KN, Pickel VM (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of the N-methyl-D-aspartate receptor and tyrosine hydroxylase in the shell of the rat nucleus accumbens. *Brain Res* 739:169-181.

Green A, Cain E, Michael T, Bardo MT (2003) Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology* 170:235-241.

Green TA, Alibhai IN, Roybal CN, Winstanley CA, Theobald DE, Birnbaum SG, Graham AR, Unterberg S, Graham DL, Vialou V, Bass CE, Terwilliger EF, Bardo MT, Nestler E (2010) Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. *Biol Psychiatry* 67:28-35.

Greenough WT, McDonald JW, Parnisari RM, Camel JE (1986) Environmental conditions modulate degeneration and new dendrite growth in cerebellum of senescent rats. *Brain Res* 380:136-143.

Grobin AC, Deutch AY (1998) Dopaminergic regulation of extracellular gamma-aminobutyric acid levels in the prefrontal cortex of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 285:350-357.

Groc L, Choquet D, Chaouloff F (2008) The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 11:868-870.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AVJ, Voorn P (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann NY Acad Sci* 877:49-63.

- Guisado E, Fernández-Tome P, Garzón J, del Río J (1980) Increased dopamine receptor binding in the striatum of rats after long-term isolation. *Eur J Pharmacol* 65:463-464.
- Hamilton DA, Kolb B (2005) Differential effects of nicotine and complex housing on subsequent experience-dependent structural plasticity in the nucleus accumbens. *Behav Neurosci* 119:355-365.
- Harati H, Majchrzak M, Cosquer B, Galani R, Kelche C, Cassel JC, Barbelivien A (2011) Attention and memory in aged rats: Impact of lifelong environmental enrichment. *Neurobiol Aging* 32:718-736.
- Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM (2007) Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav Brain Res* 185:43-48.
- Harsing LG, Zigmond MJ (1997) Influence of dopamine on GABA release in striatum: evidence for D1-D2 interactions and non-synaptic influences. *Neuroscience* 77:419-429.
- Hassan AHS, Patchev VK, von Rosenstiel P, Holsboer F, Almeida OF (1999) Plasticity of hippocampal corticosteroid receptors during aging in the rat. *FASEB J* 13:115-122.
- Hayashi M, Mistunaga F, Ohira K, Shimizu K (2001) Changes in BDNF-immunoreactive structures in the hippocampal formation of the aged macaque monkey. *Brain Res* 918:191-196.
- Haydon PG (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.
- Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR (2006) Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol* 18:393-411.
- Hibberd C, Yau JLW, Seckl JR (2000) Glucocorticoids and the ageing hippocampus. *J Anat* 197:553-562.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA. *Biotechnology (NY)* 10:413-417.
- Huang R-L, Wang C-T, Tai M-Y, Tsai Y-F, Peng M-T (1995) Effects of age on dopamine release in the nucleus accumbens and amphetamine-induced locomotor activity in rats. *Neurosci Lett* 200:61-64.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6:279-284.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol* 164:45-52.
- Ikeda H, Akiyama G, Fujii Y, Minowa R, Koshikawa N, Cools AR (2003) Role of AMPA and NMDA receptors in the nucleus accumbens shell in turning behaviour of rats: interaction with dopamine receptors. *Neuropharmacology* 44:81-87.
- Ikemoto S (2002) Ventral striatal anatomy of locomotor activity induced by cocaine, D-amphetamine, dopamine and D1/D2 agonists. *Neuroscience* 113:939-955.

- Imperato A, Honoré T, Jensen LH (1990) Dopamine release in the nucleus caudatus and in the nucleus accumbens is under glutamatergic control through non-NMDA receptors: a study in freely-moving rats. *Brain Res* 530:223-228.
- Imperato A, Puglisi-Allegra S, Casolini P, Angelucci L (1991) Changes in brain dopamine and acetylcholine releases during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res* 538:111-117.
- Imperato A, Puglisi-Allegra S, Casolini P, Zocchi A, Angelucci L (1989) Stress-induced enhancement of dopamine and acetylcholine release in limbic structures: role of corticosterone. *Eur J Pharmacol* 165:337-338.
- Isaacson JS, Solís JM, Nicoll RA (1993) Local and diffuse synaptic actions of GABA in the hippocampus. *Neuron* 10:165-175.
- Jackson ME, Moghaddam B (2004) Stimulus-specific plasticity of prefrontal cortex dopamine neurotransmission. *J Neurochem* 88:1327-1334.
- Jacobson L, Zhang R, Elliffe D, Chen KF, Mathai S, McCarthy D, Waldvogel H, Guan J (2008) Correlation of cellular changes and spatial memory during aging in rats. *Exp Gerontol* 43:929-938.
- Joëls M, Baram TZ (2009) The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10:459-466.
- Joëls M, Krugers H, Karst H (2008) Stress-induced changes in hippocampal function. *Prog Brain Res* 167:3-15.
- Joseph JA, Roth GS, Strong R (1990) The striatum, a microcosm for the examination of age-related alterations in the CNS: a selected review. *Rev Biol Res Aging* 4:181-199.
- Kalivas PW (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci* 10:561-572.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *PNAS* 102:19204-19207.
- Keefe KA, Zigmond MJ, Abercrombie ED (1993) In vivo regulation of extracellular dopamine in the neostriatum: influence of impulse activity and local excitatory amino acids. *J Neural Transm* 91:223-240.
- Kempermann G, Georg Kuhn H, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Georg Kuhn H, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- Kikusui T, Tonohiro T, Kaneko T (1999) Age-related working memory deficits in the allocentric place discrimination task: possible involvement in cholinergic dysfunction. *Neurobiol Aging* 20:629-636.
- Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3:453-462.

- King D, Zigmond MJ, Finlay JM (1997) Effects of dopamine depletion in the medial prefrontal cortex on the stress-induced increase in extracellular dopamine in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience* 77:141-153.
- Kolb B, Gorny G, Li Y, Samaha AN, Robinson TE (2003a) Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *PNAS* 100:10523-10528.
- Kolb B, Gorny G, Söderpalm AHV, Robinson TE (2003b) Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse* 48:149-153.
- Kolb B, Whishaw IQ (1998) Brain plasticity and behavior. *Ann Rev Psychol* 49:43-64.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27:95-125.
- Kudielka BM, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer DH, Kirschbaum C (2004) Differential heart rate reactivity and recovery after psychosocial stress (TSST) in healthy children, younger adults, and elderly adults: the impact of age and gender. *Int J Behav Med* 11:116-121.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Larsson F, Winblad B, Mohammed AH (2002) Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:193-207.
- Laviola G, Hannan AJ, Macrì S, Solinas M, Jaber M (2008) Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease* 31:159-168.
- Le Moine C, Bloch B (1996) Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 73:131-143.
- Leal-Galicia P, Castañeda-Bueno M, Quiroz-Baez R, Arias C (2008) Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiol Learn Mem* 90:511-518.
- Lee EHY, Hsu WL, Ma YL, Lee PJ, Chao CC (2003) Enrichment enhances the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur J Neurosci* 18:2842-2852.
- Levi G, Raiteri M (1993) Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci* 16:415-419.
- Lindley SE, Bengoechea TG, Schatzberg AF, Wong DL (1999) Glucocorticoid effects on mesotelencephalic dopamine neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 21:399-407.

- Lindroth P, Mopper K (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amount amino acids by precolumn fluorescence derivatation with *o*-phthaldialdehyde. *Ann Chem* 51:1667-1674.
- Liu L, Wang C, Ni X, Sun J (2007) A rapid inhibition of NMDA receptor current by corticosterone in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 420:245-250.
- Liu Q-Y, Schaffner AE, Chang YH, Maric D, Barker JL (2000) Persistent activation of GABA_A receptor/Cl⁻ channels by astrocyte-derived GABA in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 84:1392-1403.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402-408.
- Llorens-Martin MV, Tejada GS, Trejo JL (2010a) Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. *PLoS ONE* 5.
- Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I, Trejo JL (2010b) Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci* 44:109-117.
- Lodge DJ, Grace AA (2005) The Hippocampus Modulates Dopamine Neuron Responsivity by Regulating the Intensity of Phasic Neuron Activation. *Neuropsychopharmacology* 31:1356-1361.
- Lorens SA, Hata RJ, Handa RJ, Van de Kar LD, Gusechwan M, Goral J, Lee JM, Hamilton ME, Bethea CL, Clancy J Jr (1990) Neurochemical, endocrine and immunological responses to stress in young and old Fischer 344 male rats. *Neurobiol Aging* 11:139-150.
- Lores-Arnaiz S, Bustamante J, Arismendi M, Vilas S, Paglia N, Basso N, Capani F, Coirini H, López Costa JJ, Lores-Arnaiz MR (2006) Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. *Behav Brain Res* 169:294-302.
- Lowy MT, Gault L, Yamamoto B (1995) Adrenalectomy attenuates stress-induced elevation in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem* 61:1957-1960.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behavior and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:434-444.
- Magnusson KR (1998) Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. *Mech Ageing Dev* 104:227-48.
- Makman MH (1993) Influence of normal aging on monoamines, monoamine receptors and associated signal transduction systems. In: *Neuroregulatory mechanisms in aging* (Makman MH, Stefano GB, eds), pp 47-78. Oxford: Pergamon Press.
- Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N (2003) Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological and immunological parameters in male mice. *Hormones and Behavior* 43:281-292.

- Mark GP, Rada PV, Shors TJ (1996) Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. *Neuroscience* 74:767-774.
- McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886:172-189.
- Meaney MJ, Aitken DH, Sharma S, Viau V (1992) Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55:204-213.
- Melendez RI, Gregory ML, Bardo MT, Kalivas PW (2004) Impoverished rearing environment alters metabotropic glutamate receptor expression and function in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 29:1980-1987.
- Meredith GE, Pennartz CM, Groenewegen HJ (1993) The cellular framework for chemical signalling in the nucleus accumbens. *Prog Brain Res* 99:3-24.
- Míguez JM, Aldegunde M, Paz-Valiñas L, Recio J, Sánchez-Barceló E (1999) Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J Neural Transm* 106:1089-1098.
- Mirescu C, Gould E (2006) Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16:233-238.
- Mizoguchi K, Ikeda R, Shoji H, Tanaka Y, Maruyama W, Tabira T (2009a) Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. *Neuroscience* 159:259-270.
- Mizoguchi K, Shoji H, Tanaka Y, Maruyama W, Tabira T (2009b) Age-related spatial working memory impairment is caused by prefrontal cortical dopaminergic dysfunction in rats. *Neuroscience* 162:1192-1201.
- Mlynarik M, Johansson BB, Jezova D (2004) Enriched environment influences adrenocortical response to immune challenge and glutamate receptor gene expression in rat hippocampus. *Ann NY Acad Sci* 1018:273-280.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14:69-97.
- Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N (2002) Environmental enrichment and the brain. In: *Progress in Brain Research* pp 109-133. Elsevier.
- Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D (2004) Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 16:423-431.
- Moore H, Sarter M, Bruno JP (1992) Age-dependent modulation of *in vivo* cortical acetylcholine release by benzodiazepine receptor ligands. *Brain Res* 596:17-29.
- Mora F, Segovia G, del Arco A (2005) Envejecimiento cerebral. In: *Fisiología Humana* (Tresguerres JAF, ed), pp 1154-1162. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.
- Mora F, Segovia G, del Arco A (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev* 55:78-88.

- Mora F, Segovia G, del Arco A (2008) Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res Rev* 58:340-353.
- Morano MI, Vazquez DM, Akil H (1994) The Role of the Hippocampal Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis of the Aged Fisher Rat. *Molecular and Cellular Neuroscience* 5:400-412.
- Morari M, Marti M, Sbrenna S, Fuxe K, Bianchi C, Beani L (1998) Reciprocal dopamine-glutamate modulation of release in the basal ganglia. *Neurochem Int* 33:383-397.
- Morelli M, Fenu S, Cozzolino A, Di Chiara G (1991) Positive and negative interactions in the behavioural expression of D1 and D2 receptor stimulation in a model of parkinsonism: role of priming. *Neuroscience* 42:41-48.
- Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278:412-419.
- Mullis KB (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48:579-582.
- Naka F, Narita N, Okado N, Narita M (2005) Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev* 27:275-278.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:697-709.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2009) The neurobiology of brain and cognitive reserve: Mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol* 89:369-382.
- Nyakas C, Buwalda B, Luiten PGM, Bohus B (1992) Effect of low amphetamine doses on cardiac responses to emotional stress in aged rats. *Neurobiol Aging* 13:123-129.
- Osborne PG, O'Connor WT, Drew KL, Ungerstedt U (1990) An in vivo microdialysis characterization of extracellular dopamine and GABA in dorsolateral striatum of awake freely moving and halothane anaesthetised rats. pp 99-105.
- Paban V, Chambon C, Manrique C, Touzet C, Alescio-Lautier B (2011) Neurotrophic signalling molecules associated with cholinergic damage in young and aged rats. Environmental enrichment as a potential therapeutic agent. *Neurobiol Aging* 32:470-485.
- Pascucci T, Ventura R, Latagliata EC, Cabib S, Puglisi-Allegra S (2007) The Medial Prefrontal Cortex Determines the Accumbens Dopamine Response to Stress through the Opposing Influences of Norepinephrine and Dopamine. *Cereb Cortex* 17:2796-2804.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Peinado JM, McManus K-T, Myers RD (1986) Rapid method for micro-analysis of endogenous amino acid neurotransmitters in brain perfusates in the rat by isocratic HPLC-EC. *J Neurosci Methods* 18:269-276.

- Peña Y, Prunell M, Rotllant D, Armario A, Escorihuela RM (2009) Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 34:1390-1404.
- Pennartz CM, Groenewegen HJ, Lopes Da Silva FH (1994) The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog Neurobiol* 42:719-761.
- Pepou G, Giovannini MG (2007) Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. In: *Handbook of Microdialysis* (Westerink BHC, Cremers TIFH, eds), pp 377-398. London: Academic Press.
- Perry JL, Stairs DJ, Bardo MT (2008) Impulsive choice and environmental enrichment: Effects of d-amphetamine and methylphenidate. *Behav Brain Res* 193:48-54.
- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm A-C, Mohammed AH (1999) Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* 94:279-286.
- Piazza PV, Le Moal M (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* 19:67-74.
- Piazza PV, Rouge-Pont F, Deroche V, Maccari S, Simon H, Le Moal M (1996) Glucocorticoids have state-dependent stimulatory effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8716-8720.
- Porrás A, Mora F (1995) Dopamine-glutamate-GABA interactions and ageing: studies in the striatum of the conscious rat. *Eur J Neurosci* 7:2183-2188.
- Porrás A, Sanz B, Mora F (1997) Dopamine-glutamate interactions in the prefrontal cortex of the conscious rat: studies on ageing. *Mech Ageing Dev* 99:9-17.
- Rapp PR, Gallagher M (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial and learning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:9926-9930.
- Reul JM, Tonnarier JA, de Kloet ER (1988) Neurotrophic ACTH analogue promotes plasticity of type I corticosteroid receptor in brain of senescent male rats. *Neurobiol Aging* 9:253-260.
- Robinson TE, Justice JB (1991) *Microdialysis in the Neurosciences*. Amsterdam: Elsevier.
- Rosenzweig ES, Barnes CA (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69:143-179.
- Rosenzweig MR, Bennett EL (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 78:57-65.
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 24:1850-1856.

- Rouge-Pont F, Deroche V, Le Moal M, Piazza PV (1998) Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *Eur J Neurosci* 10:3903-3907.
- Rutherford EC, Pomerleau F, Huettl P, Strömberg I, Gerhardt GA (2007) Chronic second-by-second measures of L-glutamate in the central nervous system of freely moving rats. *J Neurochem* 102:712-722.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich H.A. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324:163-166.
- Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S (1994) Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J Neurosci Res* 39:57-62.
- Samanez-Larkin GR, Carstensen LL (2011) Socioemotional functioning and the aging brain. In: *The handbook of Social Neuroscience* (Decety J, Cacioppo JT, eds), New York.
- Sandi C, Pinelo-Nava T (2007) Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plasticity* 1-20.
- Sandi C, Venero C, Guaza C (1996) Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* 8:794-800.
- Sapolsky RM (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 34:721-732.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1983) The adreno cortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol* 18:55-64.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986a) The adrenocortical axis in the aged rat: Impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiol Aging* 7:331-335.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986b) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55-89.
- Sarter M, Parikh V, Howard HR (2009) Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat Rev Neurosci* 10:383-390.
- Scanziani M (2002) GABA spillover activates postsynaptic GABA_B receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron* 25:673-681.
- Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H (2006) Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's Ct difference" formula. *Journal of Molecular Medicine* 84:901-910.
- Schrijver NCA, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H (2002) Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:209-224.

- Segar TM, Kosckow JV, Welge JA, Herman JP (2009) Heterogeneity of neuroendocrine stress responses in aging rat strains. *Physiology and Behaviour* 96:6-11.
- Segovia G, del Arco A, De Blas M, Garrido P, Mora F (2010) Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *J Neural Transm* 117:1123-1130.
- Segovia G, del Arco A, De Blas M, Garrido P, Mora F (2008a) Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behav Brain Res* 187:304-311.
- Segovia G, del Arco A, Garrido P, De Blas M, Mora F (2008b) Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. *Neurochem Int* 52:1198-1203.
- Segovia G, del Arco A, Mora F (1999) Effects of aging on the interaction between glutamate, dopamine and GABA in striatum and nucleus accumbens of the awake rat. *J Neurochem* 73:2063-2072.
- Segovia G, del Arco A, Mora F (1997) Endogenous glutamate increases extracellular concentrations of dopamine, GABA, and taurine through NMDA and AMPA/kainate receptors in striatum of the freely moving rat: a microdialysis study. *J Neurochem* 69:1476-1483.
- Segovia G, del Arco A, Mora F (2009) Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress and aging of the brain. *J Neural Transm* 116:1007-1016.
- Segovia G, Mora F (2005a) Dopamine and GABA increases produced by activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens are decreased during aging. *Neurobiol Aging* 26:91-101.
- Segovia G, Mora F (2005b) Effects of the metabotropic glutamate receptor agonist, ACPD, on the extracellular concentrations of GABA and acetylcholine in the prefrontal cortex of the rat during the normal process of aging. *Brain Res Bull* 65:11-16.
- Segovia G, Mora F (1998) Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res Bull* 45:275-279.
- Segovia G, Porrás A, del Arco A, Mora F (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122:1-29.
- Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F (2006) Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull* 70:8-14.
- Seif GI, Clements KM, Wainwright PE (2004) Effects of distraction and stress on delayed matching-to-place performance in aged rats. *Physiology & Behavior* 82:477-487.
- Selye H (1976) Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 115:53-56.
- Sesack SR, Carr DB (2002) Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol Behav* 77:513-517.

Sesack SR, Carr DB, Omelchenko N, Pinto A (2003) Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions. *Ann NY Acad Sci* 1003:36-52.

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

Sharp T, Zetterström T (2007) What did we learn from microdialysis? In: *Handbook of Microdialysis* (Westerink BH, Cremers TIFH, eds), pp 5-16. London: Academic Press.

Shukitt-Hale B, McEwen JJ, Szprengiel A, Joseph JA (2004) Effect of age on the radial arm water maze - a test of spatial learning and memory. *Neurobiol Aging* 25:223-229.

Simpson J, Kelly JP (2011) The impact of environmental enrichment in laboratory rats--Behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res In Press*, Uncorrected Proof.

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

Smith MA, Cizza G (1996) Stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression are attenuated in aged Fischer 344/N rats. *Neurobiol Aging* 17:859-864.

Soffié M, Hahn K, Terao E, Eclancher F (1999) Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res* 101:37-49.

Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R, Jaber M (2008) Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:17145-17150.

Solinas M, Thiriet N, Rawas RE, Lardeux V, Jaber M (2009) Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology* 34:1102-1111.

Song I, Huganir RL (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25:578-588.

St.Jacques PL, Bessette-Symons B, Cabeza R (2009) Functional neuroimaging studies of aging and emotion: fronto-amygdalar differences during emotional perception and episodic memory. *Journal of the International Neuropsychological Society* 15:819-825.

Stairs DJ, Bardo MT (2009) Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacol Biochem Behav* 92:377-382.

Steinhäuser C, Gallo V (1996) News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 19:339-345.

Stevenson CW, Gratton A (2003) Basolateral amygdala modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress: role of the medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 17:1287-1295.

- Strasser A, Skalicky M, Hansalik M, Viidik A (2006) The impact of environment in comparison with moderate physical exercise and dietary restriction on BDNF in the cerebral parietotemporal cortex of aged Sprague-Dawley rats. *Gerontology* 52:377-381.
- Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A (2010) The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Molecular Psychiatry* doi:10.1038/mp.2009.151.
- Taber MT, Baker GB, Fibiger HC (1996) Glutamate receptor agonists decrease extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens in vivo. *Synapse* 24:165-172.
- Taepavarapruk P, Floresco SB, Phillips AG (2000) Hyperlocomotion and increased dopamine efflux in the rat nucleus accumbens evoked by electrical stimulation of the ventral subiculum: role of ionotropic glutamate and dopamine D1 receptors. *Psychopharmacology* 151:242-251.
- Takahata R, Moghaddam B (1998) Glutamatergic regulation of basal and stimulus-activated dopamine release in the prefrontal cortex. *J Neurochem* 71:1443-1449.
- Tang Y-P, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41:779-790.
- Tarazi FI, Baldessarini RJ (1999) Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *J Neurosci Res* 55:401-410.
- Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK, Baldessarini RJ (1998) Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synapse* 30:227-235.
- Terry RD, Katzman R (2001) Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? *Neurobiol Aging* 22:347-348.
- Timmerman W, Westerink BHC (1997a) Electrical stimulation of the substantia nigra reticulata: detection of neuronal extracellular GABA in the ventromedial thalamus and its regulatory mechanism using microdialysis in awake rats. *Synapse* 26:62-71.
- Timmerman W, Westerink BHC (1997b) Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27:242-261.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation and function. *Pharmacological Reviews* 62:405-496.
- Turner AJ, Whittle SR (1983) Biochemical dissection of the g-aminobutyrate synapse. *Biochem J* 209:29-41.
- Turner CA, Lewis MH (2003) Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and neurotrophin levels. *Physiology & Behavior* 80:259-266.
- Turner CA, Yang MC, Lewis MH (2002) Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and regional neural metabolic activity. *Brain Res* 938:15-21.

- Tye SJ, Miller AD, Blaha CD (2009) Differential corticosteroid receptor regulation of mesoaccumbens dopamine efflux during the peak and nadir of the circadian rhythm: a molecular equilibrium in the midbrain? *Synapse* 63:982-990.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397-409.
- Ungerstedt U (1991) Introduction to intracerebral microdialysis. In: *Microdialysis in the Neurosciences* (Robinson TE, Justice JB, eds), pp 3-18. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV.
- Valasek MA, Repa JJ (2005) The power of RT-PCR. *The American Physiological Society* 29:151-159.
- Van Bockstaele EJ, Pickel VM (1995) GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682:215-221.
- van Eekelen JAM, Rots NY, Sutanto W, de Kloet ER (1992) The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the Brown Norway rat. *Neurobiol Aging* 13:159-170.
- Van Guilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44:619-626.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427-13431.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.
- Venema K, Leever W, Bakker JO, Haayer G, Korf J (1983) Automated precolumn derivatization device to determine neurotransmitter and other amino acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 260:371-376.
- Venero C, Borrell J (1999) Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur J Neurosci* 11:2465-2473.
- Vizi ES, Fekete A, Karoly R, Mike A (2010) Non-synaptic receptors and transporters involved in brain functions and targets of drug treatment. *Br J Pharmacol* 160:785-809.
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Schousboe A (1999) The GABA paradox: Multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J Neurochem* 73:1335-1342.
- Wang B, Shaham Y, Zitzman D, Azari S, Wise RA, You ZB (2005) Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. *J Neurosci* 25:5389-5396.
- Wang B, You ZB, Rice KC, Wise RA (2007) Stress-induced relapse to cocaine seeking: roles for the CRF(2) receptor and CRF-binding protein in the ventral tegmental area of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 193:283-294.

- Westerink BHC (2000) Analysis of biogenic amines in microdialysates of the brain. *J Chromatogr* 747:21-32.
- Westerink BHC, Tuntler J, Damsma G, Rollema H, De Vries JB (1987) The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336:502-507.
- Wiegert O, Joëls M, Krugers H (2006) Timing is essential for rapid effects of corticosterone on synaptic potentiation in the mouse hippocampus. *Learn Mem* 13:110-113.
- Willuhn I, Wanat MJ, Clark JJ, Phillips PEM (2010) Dopamine signaling in the nucleus accumbens of animals self-administering drugs of abuse. *Current Topics in Behavioral Neuroscience* 3:29-71.
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39:75-85.
- Wood DA, Buse JE, Wellman CL, Rebec GV (2005) Differential environmental exposure alters NMDA but not AMPA receptor subunit expression in nucleus accumbens core and shell. *Brain Res* 1042:176-183.
- Wu M, Brudzynski SM (1995) Mesolimbic dopamine terminals and locomotor activity induced from the subiculum. *NeuroReport* 6:1601-1604.
- Yamada H, Bruijnzeel AW (2011) Stimulation of $\alpha 2$ -adrenergic receptors in the central nucleus of the amygdala attenuates stress-induced reinstatement of nicotine seeking in rats. *Neuropharmacology* 60:303-311.
- Yang CR, Chen L (2005) Targeting prefrontal cortical dopamine D1 and N-Methyl-D-Aspartate receptor interactions in Schizophrenia treatment. *Neuroscientist* 11:452-470.
- Youngren KD, Daly DA, Moghaddam B (1993) Distinct actions of endogenous excitatory amino acids on the outflow of dopamine in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 264:289-293.
- Yuen EY, Liu W, Karatsoreos IN, Ren Y, Feng J, McEwen BS, Yan Z (2010) Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Mol Psychiatry*.
- Yurek DM, Hipkens SB, Hebert MA, Gash DM, Gerhardt GA (1998) Aged related decline in striatal dopamine release and motoric function in Brown Norway/Fisher 344 hybrid rats. *Brain Res* 791:246-256.
- Zambrana C, Marco EM, Arranz L, de Castro NM, Viveros MP, de la Fuente M (2007) Influence of Aging and Enriched Environment on Motor Activity and Emotional Responses in Mice. *Ann NY Acad Sci* 1100:543-552.
- Zanassi P, Paolillo M, Montecucco A, Avvedimento EV, Schinelli S (1999) Pharmacological and molecular evidence for dopamine D1 receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J Neurosci Res* 58:544-552.
- Zavitsanou K, Mitsacos A, Giompres P, Kouvelas ED (1996) Changes in [3 H] AMPA and [3 H] kainate binding in rat caudate-putamen and nucleus accumbens after 6-

hydroxydopamine ledions of the medial forebrain bundle: an autoradiographic study. *Brain Res* 731:132-140.

Zhao M-G, Toyoda H, Wang Y-K, Zhuo M (2009) Enhanced synaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of adult wild mice as compared with that in laboratory mice. *Molecular Brain* 2:11-17.

Zhu J, Apparsundaram S, Bardo MT, Dwoskin LP (2005) Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem* 93:1434-1443.

Zhu J, Green T, Bardo MT, Dwoskin LP (2004) Environmental enrichment enhances sensitization to GBR 12935-induced activity and decreases dopamine transporter function in the medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 148:107-117.

Zhu S-W, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH (2006) Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res* 169:10-20.

Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Würbel H (2001) Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res* 121:11-20.

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

Zoli M, Cintra A, Zini I, Hersh LB, Gustafsson JA, Fuxe K, Agnati LF (1990) Nerve cell clusters in dorsal striatum and nucleus accumbens of the male rat demonstrated by glucocorticoid receptor immunoreactivity. *J Chem Neuroanat* 3:355-366.

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

Zornoza-Sabina T, Cano-Cebrián MJ, Miquel M, Aragón C, Polache A, Granero L (2005) Hippocampal dopamine receptors modulate the motor activation and the increase in dopamine levels in the rat nucleus accumbens evoked by chemical stimulation of the ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 30:843-852.