

1994 - B

087732754

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

---

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



ACTIVIDAD DE LA COLINA ACETILTRANSFERASA (E.C.2.3.1.6.)  
EN DIFERENTES REGIONES DEL CEREBRO DE RATAS ADULTAS  
TRATADAS NEONATALMENTE CON GLUTAMATO MONOSODICO.

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

IRMA GRICELDA ADAME GONZALEZ

GUADALAJARA, JAL. AGOSTO DE 1995

ACTIVIDAD DE LA COLINA ACETILTRANSFERASA (E.C.2.3.1.6)  
EN DIFERENTES REGIONES DEL CEREBRO DE RATAS ADULTAS  
TRATADAS NEONATALMENTE CON GLUTAMATO MONOSODICO.

## AGRADECIMIENTOS

A mí familia que siempre me han alentado y me han dado mucho de su tiempo para continuar adelante y llegar hasta este momento, mil gracias.

Al M. en C. Carlos Beas Zárate, por la dirección y apoyo que sin ello no hubiera sido posible la realización de la presente tesis.

Al M en C. Daniel Ortuno Sahagún, por sus valiosos consejos, su amistad y su gran apoyo que siempre me ha brindado.

Al Biol Francisco Garza Briseno y a la Biol Monica Elisa Urena, por su amistad y su ayuda en la realización de la presente tesis.

A mis compañeros de licenciatura Paty Navarro, Celia Guerreo, Silvia Zalapa, Rosario Sandoval, Katy Tostado , Rocio Estrada, Yesica Higareda, Marichuy Cossio, Zulette Andrade, Enrique Ambríz, Sergio Rizo, David Politron y Paco, que siempre me alentaron en los buenos y malos momentos, gracias por los gratos momentos compartidos.

Y especialmente a Mayra y Lety, mil gracias por su amistad, su gran apoyo y por todos los momentos de alegrías y tristezas que hemos compartido juntas.

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección del M. en C. Carlos Beas Zárate. Y asesoría del M. en C. Daniel Ortuño Sahagún.

## I N D I C E

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iii
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES.....	12
III. HIPOTESIS.....	16
IV. OBJETIVOS.....	17
V. MATERIAL Y METODOS.....	18
VI. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	21
VII. RESULTADOS.....	22
VIII DISCUSION.....	24
IX. CONCLUSIONES.....	29
X. BIBLIOGRAFIA.....	30
XI. FIGURAS Y GRAFICAS.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS.

AC	Acetilcolina
ACE	Acetilcolinesterasa
Asp	Aspartato
[ <sup>3</sup> H] Acetil CoA	Acetil coenzima A marcada con tritio
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca <sup>++</sup>	Ion calcio
CAT	Colina acetiltransferasa
CE	cuerpo estriado
CF	corteza frontal
Cl <sup>-</sup>	Ión cloro
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra-acético
GABA	Acido gama-aminobutírico
Glu	Glutamato
GMS	Glutamato monosódico
Hp	Hipocampo
i.p.	Intraperitoneal
K <sup>+</sup>	Ión potasio
Kd	Kilodaltones
Km	Constante de Michaelis
mm	milímetros
M	Molar
mM	Milimolar
μm	Micromolar
mg	Miligramos
μg	Microgramos
ml	Mililitros
μl	Microlitros

mCi	MiliCuries
Na+	Ión Sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
pMoles	Picomoles
pH	Potencial de hidrógeno
NBM	Núcleos basales de Meynert
[ <sup>3</sup> H]QNB	Quinuclidil benzilato tritiado
s.c.	Subcutánea
SENaCl	Solución de NaCl equimolar a GMS
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico



BIBLIOTECA CENTRAL

## R E S U M E N

El glutamato (Glu) es un aminoácido que forma parte de la mayoría de las proteínas, se considera un neurotóxico ya que en altas concentraciones produce destrucción neuronal en diferentes especies animales, por lo que resulta de interés conocer los mecanismos implícitos en el daño celular, ya que es semejante al que se presenta en algunas enfermedades neurodegenerativas, cuya característica principal es la vulnerabilidad de las neuronas GABAérgicas y colinérgicas al daño celular bajo condiciones patológicas antes descritas. En el presente trabajo se evaluó la actividad de la Colina acetiltransferasa (CAT) como un parámetro de neurotransmisión del sistema colinérgico bajo el efecto del Glu administrado neonatal (1,3,5 y 7 días de edad), por vía s.c. a dosis de 4 mg/g de peso. Así mismo se midió la actividad de la CAT a los 30, 60 y 90 días de edad en la corteza frontal (CF), cuerpo estriado (CE), hipocampo (Hp) y núcleos basales de Meynert (NBM). Los resultados muestran que la actividad de la CAT se reduce en forma importante en la CF del grupo tratado con Glu en relación al grupo testigo en las tres edades mientras que en el Hp ésta reducción solo se observa a los 30 días de edad y en los NBM se muestra ésta reducción en las tres edades, no siendo significativa a los 60 días, en el CE se observó un aumento en la actividad de la CAT en los grupos tratados con Glu y con NaCl, en relación al grupo intacto y sólo en las dos primeras edades, Estos resultados indican que el efecto neurotóxico del Glu afecta a la CF y a los NBM, más que a las otras regiones estudiadas. Los resultados sugieren que sólo algunas neuronas colinérgicas del SNC son vulnerables al efecto del Glu y éste efecto se mantiene a lo largo de todo el desarrollo, mientras que en las otras regiones es posible que se desarrollen mecanismos de compensación (plasticidad cerebral) en las diversas edades.

## I.- INTRODUCCION

El sistema nervioso (SN), comúnmente se divide en sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico (SNP), y sistema nervioso autónomo (SNA). El SNC se conforma por el encéfalo, que se ubica en el cráneo y la médula espinal que se aloja en el conducto raquídeo y en conjunto representan el SNC en forma integral. El SN es un conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo responde adecuadamente a los estímulos del medio externo e interno (López Antúnez 1983). Se compone de tres elementos básicos: 1) células nerviosas, llamadas neuronas; 2) células intersticiales, que incluye células de neuroglia, de neurolema y células satélites; 3) elementos del tejido conjuntivo, como células fibroblásticas y sus productos fibrosos. La neurona es el elemento fundamental, constituye la unidad morfológica, funcional y ontogénica del SN, a través de ellas se transmite el impulso nervioso que, para viajar de una neurona a otra, debe atravesar el espacio extracelular, el cual se realiza mediante la liberación de un compuesto químico (neurotransmisor) capaz de estimular a la célula contigua, dicho fenómeno se conoce como sinápsis química. La sinápsis constituye uno de los medios de comunicación entre las células y se han descrito muchas variedades de ellas; desempeña un papel importante en las actividades integradoras del SN, cada fibra nerviosa puede transmitir impulsos en ambas direcciones hacia la neurona o fuera de ella. La conducción en una serie de neuronas se realiza en una sola dirección (conducción unidireccional). (Noback, Charles R; Robert, J.D. 1980). La sinápsis se puede establecer a diferentes niveles de la neurona, esto es; como

contactos de tipo axón-dendrita, axón-cuerpo celular, dendrita-dendrita, axón-axón y cuerpo celular-cuerpo celular.

#### LOCALIZACION NEUROANATOMICA DE LA CORTEZA CEREBRAL

La corteza cerebral es una capa de sustancia gris, cuya composición la conforman neuronas dispuestas en estratos que cubre los hemisferios cerebrales, aproximadamente 24 decímetros cuadrados; y su grosor varía desde 4 mm en el giro precentral (corteza motora) a 1.5 mm en la corteza visual primaria; su peso total es de alrededor de 600 gr y constituye el 40 % del peso total del cerebro. La organización elemental de la corteza se basa en columnas de neuronas orientadas vertical y horizontalmente en relación a la superficie cortical, las fibras aferentes de la corteza van radialmente hacia la superficie cortical teniendo conexión entre las células de la capa horizontal. Algunas de las fibras eferentes del talamo terminan en las células de la corteza, principalmente de células piramidales (capa IV), otras llegan de muy diversas áreas por asociación de fibras, un tercer grupo de fibras llegan de varias estructuras subcorticales específicas del tálamo, esto incluye el locus coeruleus, (origen de fibras noradrenérgicas); el núcleo del rafe del tronco cerebral (origen de proyecciones serotoninérgicas), los núcleos de Meynert (en el telencéfalo basal, origen de proyecciones colinérgicas) y el cuerpo calloso (fibras comisurales). Presentan tres tipos de células neuronales principalmente: células piramidales, células satélites y células fusiformes, cuyos principales neurotransmisores de la corteza son; el glutamato, el aspartato (Asp) y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Manter y Gatz's 1987) (fig 1).

### LOCALIZACION NEUROANATOMICA DEL CUERPO ESTRIADO

En la actualidad el término cuerpo estriado se reserva para el núcleo lenticular (con sus dos partes: putamen y pálido), el núcleo caudado y la amígdala, sin embargo comunmente se le llama estriado solamente al neostriado.

#### Fibras aferentes al cuerpo estriado

- a) córtico-estriatales: son fibras que se originan en todas las regiones corticales y se proyectan en forma somatotópicamente organizada al estriado,
- b) Tálamo-estriatales: el estriado recibe fibras de los núcleos intralaminares, centro mediano y dorso medial del tálamo.
- c) Nigro-estriatales: constituyen una de las más importantes vías aferentes al putamen, comprenden fibras que se originan en las partes compacta y reticular de la sustancia negra y ascienden al subtálamo pasan entre las fibras de la cápsula interna para terminar en su mayor parte en el putamen.

#### Fibras eferentes al cuerpo estriado.

La mayor proyección eferente del estriado va hacia el pálido, en el cual llegan fibras tanto del caudado como del putamen, aunque la mayor parte provienen de este último, (fig 1).

### LOCALIZACION NEUROANATOMICA DEL HIPOCAMPO.

La formación hipocampal (Hp) está constituida por el arquipalio que corresponde a la corteza filogenéticamente más primitiva. Presenta tres zonas de fibras aferentes para su formación, que derivan de varias fuentes, un sitio importante es la corteza endorinal, esta area da nacimiento a una serie de vías que cruzan a traves de la capa molecular del giro dentado y del cuerno de Ammon hasta inervar gran parte de la formación del Hp. Una segunda fuente emerge de la banda diagonal del área septal, desde esta región las fibras penetran en la formación del Hp a traves del haz del fornix. La tercer zona comprende; corteza prefrontal, giro del

cíngulo, y el núcleo talámico anterior.

La vías eferentes se originan en los axones de las células piramidales de Ammon y del complejo subicular y forman la inmensa mayoría de los axones encontrados en el sistema del fornix, una segunda vía pasa por el caudal a la comisura anterior y desciende a través del hipotálamo e inerva cuerpos mamilares (Lawrence House. E, y col 1982) (fig 1).

#### LOCALIZACION NEUROATOMICA DE LOS NUCLEOS BASALES DE MEYNERT

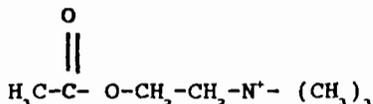
Los núcleos de Meynert fueron primeramente denominados como ganglios basales de Meynert, por Koellieker (1896) ahora denominados núcleos basales de Meynert, localizados en la sustancia innominata en la parte ventral en el putamen y globus pallidus. Es una de las principales áreas de el sistema colinérgico del cerebro frontal basal que inerva la amígdala, hipocampo y neocorteza.

Por estudios citológicos y fisiogenéticos del cerebro frontal basal se dividen los núcleos basales en tres grupos:

- 1- El núcleo septal medial y el núcleo de la banda diagonal de Broca.
- 2- Las extensivas neuronas de el tuberculum olfactorio.
- 3- El núcleo basal. (fig 1)

#### ACETILCOLINA (AC)

La AC a pesar de ser el principal neurotransmisor en el SNC de los mamíferos, también está presente en bacterias, hongos. protozoarios e incluso en plantas con diversas funciones, cuya formula desarrollada es la que sigue.



### Síntesis y degradación de la AC

La AC se sintetiza a partir de la colina, que se acumula en las neuronas colinérgicas mediante una reacción de la acetil CoA y bajo la acción de la colina acetiltransferasa (CAT) (E.C.1.3.1.6.)

CAT

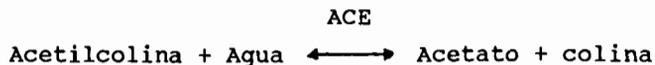


La CAT se localiza en el SNC específicamente donde tiene lugar la síntesis de AC. La mayor actividad de la CAT se encuentra en el núcleo interpenduncular, núcleo caudado, la retina, el epitelio coronal, hipocampo, corteza cerebral y las raíces centrales de la médula. (Cooper, J.R, y col 1984). La síntesis de la AC se lleva a cabo dentro de las neuronas colinérgicas a nivel de las terminales nerviosas, también está presente en los axones, por donde se transporta desde el sitio de síntesis en el soma. ( Taylor, P., Brown, H.J 1994). Sin embargo, también se ha demostrado por inmunohistoquímica que la CAT está presente en dendritas de los cuerpos celulares.

En 1943 Nachmansohn y Machado descubrieron por primera vez la actividad de la CAT en un sistema libre de células, desde entonces, se le ha purificado y definido algunas de sus características, principalmente la que se encuentra en los ganglios cefálicos del calamar, de placenta humana, de Drosophila melanogaster de Torpedo californica y del cerebro de rata. La enzima de cerebro de rata purificada tiene un peso molecular aproximadamente de 66 a 70 Kd, con una constante de Michaelis (Km) de  $7.5 \times 10^{-4}$  M para la colina y de  $1.0 \times 10^{-5}$  M para la acetil CoA. La CAT se localiza Intracelularmente en el cerebro de mamíferos principalmente en la fracción mitocondrial y se recupera en la fracción sinaptosomal donde se encuentra en el sinaptoplasma en forma libre (Taylor, P., y Brow, H. J 1994). La acetil CoA que se utiliza para la síntesis de AC en el cerebro de mamíferos

proviene de la glucólisis y del sistema de la piruvato-oxidasa. La acetil CoA se sintetiza preferentemente en las mitocondrias, aunque no se conoce como se transporta hacia afuera de la mitocondria para participar en la síntesis de la AC, sin embargo existen dos caminos probables que se han propuesto para su transporte al exterior de la mitocondria; por intercambio con la carnitina o por el citrato los cuales atraviesan la barrera mitocondrial. ( Laguna, J., Pina G. E., 1988)

La colina no puede ser sintetizada de novo por las neuronas por lo que después de la síntesis de AC y la hidrólisis por la acetilcolinesterasas (E.C. 3.1.1.7) se transporta nuevamente a la terminal presináptica por un sistema de transporte activo de alta afinidad dependiente de sodio, para que vuelva a utilizarse en la síntesis de AC. La colina atraviesa la membrana celular por dos mecanismos que se conocen como transporte de alta y baja afinidad. El transporte de alta afinidad con una  $K_m$  para la colina de 1-5  $\mu M$  y que es saturable. El transporte de baja afinidad con una  $K_m$  de 40 a 80  $\mu M$  al parecer opera mediante un proceso de difusión pasiva, directamente dependiente de la concentración de colina y casi insaturable (Cooper, J.R y col 1982). La degradación de la AC se lleva a cabo en el espacio intersináptico por la acetilcolinesterasa (ACE) ésta se encuentra en las neuronas presinápticas y postsinápticas. (Atack y col, 1983; Greenfield 1984; Smith y Cuello 1984). La ACE hidroliza AC para formar acetato y colina de acuerdo con la siguiente reacción:



La ACE es una importante enzima del SN de vertebrados e invertebrados. Esta enzima al igual que la CAT se encuentra

en el soma neuronal y se caracteriza por ser una enzima membranal. De acuerdo a la especificidad del sustrato, las colinesterasas se subdividen en dos grupos: las acetilcolinesterasas (E.C. 3.1.1.7) y las butirilcolinesterasas (E.C. 3.1.1.8.). Estructuralmente, se dividen en dos clases, la primera clase se caracteriza por una asociación homóloga de subunidades catalíticas idénticas en monómeros, dímeros y tetrámeros, que varían en el grado de hidrofobicidad, por la adición de un glucofosfolípido en el carboxilo terminal de las subunidades. La segunda clase es una asociación heteróloga de subunidades catalíticas unidas mediante enlaces disulfuro que pueden estar asociadas a filamentos de colágeno (polímero asimétrico) o a lípidos de membrana (tetrámero) (George, S., Bernardo 1991)

#### LIBERACION DE LA AC.

La liberación de AC depende del aumento de la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular a través de la despolarización de la membrana presináptica lo que activa canales de  $Ca^{++}$  sensibles a voltaje. El mecanismo por el cual este incremento en la concentración de  $Ca^{++}$  induce la liberación de AC se desconoce, sin embargo, es posible que se realice la fosforilación o activación de proteínas de membrana que permiten la fusión de la vesícula con la membrana neuronal, como parte del mecanismo de liberación. Así la apertura de los canales que mueven  $Ca^{++}$  del líquido extracelular al interior de la terminal nerviosa, resulta ser el detonador que dispara la fusión de numerosas vesículas sinápticas con la membrana plasmática subyacente, de tal manera que el contenido de dichas vesículas se vacía hacia el espacio sináptico, una vez liberada la sustancia transmisora se difunde a través del espacio intersináptico y se une selectivamente con moléculas receptores que están presentes en la membrana, los cuales pueden ser de dos tipos : nicotínicos y muscarínicos. (fig 2)

## RECEPTORES PARA AC

En el SNC la modulación de la actividad neuronal se lleva a cabo por la acción de neurotransmisores endógenos que específicamente interactúan con proteínas receptores que se localizan sobre la membrana a nivel sináptico de células nerviosas. Estudios recientes identifican la multiplicidad de receptores colinérgicos así como los mecanismos moleculares de la activación de receptores, estos estudios indican que las acciones de la AC es mucho más compleja de lo que originalmente se pensó (Kupfermann 1979; Bloom 1988; Mattson 1988; Nicoll 1988; Strange 1988; El-Fakahany y col.1988). Así, la clasificación de los receptores colinérgicos en el SNC de mamíferos se basa en la actividad farmacológica de dos alcaloides: nicotina y muscarina, de ahí su denominación.

La existencia de cierta variedad de receptores que explicaría las diferentes actividades de AC que se dió a conocer por los experimentos realizados por Dale (1914). El receptor de tipo nicotínico para AC fue el primero en purificarse y determinarse su estructura primaria en la rata (Numa y col,1983; Changeux y col, 1984).

Los receptores nicotínicos poseen una alta afinidad a atropina encontrados en la unión neuromuscular denominados N1 y los N2 localizados en ganglio periférico, mientras que los receptores muscarínicos se han clasificado como M1 y M2 de acuerdo a la alta y baja afinidad a pirenzepina respectivamente (Hammer y col 1980; Watson y col 1983; Keller y col 1985). Los receptores M1 se localizan predominantemente en cuerpo estriado, hipocampo y corteza cerebral, los receptores M2 con alta afinidad al agente AF-DX 116 se localizan principalmente en el cerebelo y corteza cerebral ( Watson y col 1985; Mash y col 1985; Mash y Potter 1986 Vogt 1988; Aubert y col 1992).

Estudios de biología molecular demuestran la posibilidad de realizar la clonación y la secuenciación de receptores

muscarínicos. En la rata, se han identificado por técnicas de biología molecular, al menos cinco genes diferentes, denominados m1, m2, m3, m4, m5 para distinguir éstos de los receptores M1, M2, M3, identificados farmacológicamente (Hulme y col 1990). Los subtipos m1, m2, y m3 parecen coincidir con los M1, M2 y M3, los m5 presentan una afinidad intermedia; en cambio el m4 es de alta afinidad por los que puede ser parte del conjunto de tipo M1 ( Schliebs., y Beas, Z.C 1990) (fig 3).

### EL SISTEMA COLINERGICO EN EL CEREBRO

Desde las primeras cuantificaciones de AC en el cerebro, muchas de las evidencias sobre la localización de vías colinérgicas en el cerebro han sido obtenidas por estudios histoquímicos para la acetilcolinesterasa (ACE). Sin embargo, con el desarrollo de anticuerpos específicos para la colina acetiltransferasa (CAT) y la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas para la localización de estructuras colinérgicas ha sido posible desarrollar un mapeo sobre la distribución de la neuronas y fibras colinérgicas con alto grado de precisión (Wainer y col.1984). Desde entonces, se ha obtenido bastante información sobre la distribución de estructuras colinérgicas en el cerebro de humanos y ratas (Park, D.H y col 1982; levey y col 1982; y Wainer 1982;).

En este sentido es posible definir claramente la distribución anatómica de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal, y sus conexiones hacia la corteza cerebral (Wainer y Mesulam, 1990). Así, la corteza cerebral es rica en AC y sus enzimas (CAT,ACE) (Kuhar,1976). De ésta manera, para dar a conocer la heterogeneidad de los núcleos que contienen AC y a la organización de las proyecciones colinérgicas, se introdujo una clasificación que designa "ch" y con numero progresivo a cada nucleo (ch1-ch8), por lo que las neuronas colinérgicas se localizan en el cerebro frontal

basal (ch1-ch4) proporcionan la mayor fuente de inervación colinérgica a la corteza cerebral, hipocampo, amígdala y bulbo olfatorio, mientras que las neuronas colinérgicas en el tallo cerebral (ch5-ch6) proporcionan la mayor fuente de inervación colinérgica hacia el tálamo, hipotálamo y cerebro anterior basal. Un punto potencialmente importante de interacción directa ocurre al nivel del núcleo talámico reticular que recibe entradas colinérgicas del cerebro frontal basal y tallo cerebral. Las proyecciones de células colinérgicas que parten del tallo cerebral hacia el cerebro frontal basal constituyen otras vías a través de las cuales estos dos sistemas pueden actuar concertadamente. (Mesulam y col; 1983; Rye y col, 1984; Saper, 1984) (fig 4).

#### **IMPORTANCIA DEL SISTEMA COLINERGICO Y SUS IMPLICACIONES**

Recientemente el sistema colinérgico ha sido el foco de atención de numerosos estudios neuroquímicos y neuropatológicos. Así, se ha demostrado que ciertos grupos de neuronas colinérgicas poseen propiedades electrofisiológicas y anatómicas que permiten el control de la excitabilidad del SNC, incluyendo las regiones cerebrales como corteza cerebral, hipocampo, y tálamo.

Las neuronas colinérgicas constituyen el principal origen de aferentes a la neocorteza en primates, carnívoros y ratas, la existencia de tales proyecciones fueron primeramente propuestos por Shute y Lewis (1967), posteriormente fueron confirmadas con el estudio enzimático de la ACE y CAT. El papel funcional del sistema colinérgico en el aprendizaje y la memoria ha sido reconocido en numerosos estudios en humanos. También se ha demostrado la degeneración de neuronas colinérgicas en varias regiones del cerebro de rata con lesiones neurotóxicas que inciden en una deficiencia en el aprendizaje así como en la capacidad del

sistema visual en el individuo. En 1982 Whitehouse y col. reportaron una pérdida de células en los núcleos basales magnocelulares, como también una reducción de la actividad cortical de CAT en pacientes con Alzheimer, desde entonces numerosas investigaciones han reportado que lesiones neurotóxicas en ratas provocan dano celular en el sistema colinérgico.

## II.- ANTECEDENTES

Una de las características neuropatológicas que se encuentran en diversas enfermedades neurodegenerativas, como la de Alzheimer, es la degeneración de neuronas colinérgicas en la corteza frontal que induce una pérdida severa de inervación colinérgica cortical. (Lehéricy, S., y col 1991). Además estudios inmunohistoquímicos han confirmado, la pérdida celular de neuronas colinérgicas en los núcleos basales de Meynert (Nagai,T; McGeer,P,L: y col 1983 ), así como en la region basal del estriado (Lehéricy,S; Hirsch, E.C; y col 1989) . Otros estudios indican que la actividad de la CAT se reduce substancialmente en la neocorteza e hipocampo así como el número de neuronas en los núcleos basales de Meynert del cerebro frontal basal.

En la enfermedad de Parkinson el sistema colinérgico innominato-cortical y septo-hipocampal parece estar dañado por la pérdida neuronal de la substancia innominata región responsable de los procesos visuales, (Candy y col 1983 ; Witehouse y col 1983) así como la disminución de la actividad de la CAT en neocorteza e hipocampo (Ruberg y col 1983; Dubois y col 1983). Por otro lado, se conoce ampliamente que ciertos aminoácidos estan involucrados en la excitabilidad del SNC, como son: acido glutámico (Glu), aspartato (Asp) y glicina. Desde hace muchos años se reconoce que el Glu y el Asp se encuenetran en concentraciones elevadas (1 a 10  $\mu\text{mol/gr}$  ) en el cerebro, y ejercen efectos estimulantes muy potentes sobre la actividad neuronal. (Butcher., Hamberger, 1987., Robinson y Coyle, 1987 ).

El Glu ocupa una posición central en el metabolismo del cerebro lo que le ha permitido ser objeto de numerosos estudios durante las últimas décadas. Su papel en el metabolismo fue propuesta por Krebs (1935), es un aminoácido no esencial que no cruza la barrera hematoencefálica por lo que en el cerebro se sintetiza a partir de glucosa y otros precursores por diversas rutas, la vía principal parece ser la de la glutaminasa ya que esta enzima se encuentra en altas concentraciones en las terminales nerviosas (Colome. L. A. M 1983)(fig 5).

La idea inicial de que el Glu podría ser el principal neurotransmisor surgió en 1920, años atrás se había demostrado que la concentración de Glu en el cerebro era mucho más elevada que en los demás tejidos, esto hizo suponer que tendría un papel importante en el SNC, por lo que se le dio una función metabólica cerebral o como compensatorio de la deficiencia aniónica cerebral (Waelsch 1951), no como neurotransmisor. Posteriormente, se realizaron estudios en invertebrados específicamente en músculo de crustáceos (Takeuchi 1964) donde se demostró claramente la acción del Glu como neurotransmisor. La presencia de este aminoácido no se limita a un tipo particular de neuronas, ya que por medio de estudios inmunquímicos y neuroquímicos sugieren que la mayoría de las vías glutamatergicas se proyectan desde y hacia la corteza cerebral y el hipocampo, las vías son, cortico-estriatal, cortico-hipocampal, cortico-cortical, y la entorrinal-hipocampal, hipocampales y corticales que se van hacia los núcleos hipotálamicos (McGeer, P.L., Eccles, J. C., y Mc Geer, E.G 1987).

#### NEUROTOXICIDAD DEL GLUTAMATO .

En la década pasada se incrementó el interés por el Glu, debido al efecto neurotóxico que ejerce al acumularse en el espacio intersináptico (Olney 1978). El Glu administrado

sistémicamente en dosis subconvulsivas a ratones neonatos provoca una rápida degeneración neuronal, en la periferia del núcleo arcuato del hipotálamo y de células ganglionares de la retina, mientras que en ratones adultos se requiere de la administración intracerebral de grandes dosis para alcanzar los niveles tóxicos. Los mecanismos a través de los cuales el Glu produce daño neuronal se desconocen, sin embargo, se ha propuesto que es una consecuencia directa de la sobre excitación que ejerce sobre las neuronas postsinápticas. Esta sobre excitación promueve la apertura de canales iónicos y facilita la entrada masiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ , así como de  $\text{Cl}^-$  y agua. Sin embargo, el efecto tóxico del Glu parece ser dependiente de la entrada masiva de  $\text{Ca}^{++}$  al interior de la célula (Choi 1987) posiblemente a través de la activación de receptores NMDA, el cual se ha implicado en un gran número de procesos patológicos, que incluyen cuadros de anoxia, isquemia e hipoglicemia (Benveniste y col 1984., Globus y col 1983); y transtornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington y la epilepsia, entre otras. El Glu interactúa al menos con tres tipos de receptores en la region postsináptica, que han sido clasificados en base a agonistas selectivos por medio de estudios electrofisiológicos: el ya mencionado receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), quisqualato (quis) o 3-amino-4-hidroxi-5-metil isooxazol (AMPA) y kainato, estos dos últimos denominados NO-NMDA (Keinanen y col 1990; Sommer y Seeburg 1992).

En general se observa que los animales neonatos son más sensibles al efecto citotóxico del glu que los adultos esto posiblemente se debe a que no existe barrera hematoencefálica (BHE) y posiblemente también a que el sistema de recaptura de este aminoácido aún no esta completamente desarrollado (Olney 1971).

Por otra parte, estudios previos realizados en nuestro laboratorio con ratas, muestran que desde los 14 hasta los 21

días de edad resulta ser la etapa mas susceptible del sistema colinérgico al efecto del Glu, cuando se administra neonatalmente. Así los resultados mostraron una marcada reducción en la unión de [ $^3\text{H}$ ]QNB a los receptores muscarínicos, en la corteza frontal y cuerpo estriado; al mismo tiempo en estas regiones se encontró una disminución en la actividad de la CAT desde los 7 hasta los 21 días de edad. Estos resultados en su conjunto podrían indicar que el Glu produce dano en algunas células de tipo colinérgico en ambas regiones, además de que éstos resultados se apoyan con estudios histológicos realizados bajo el mismo esquema. (Beas- Zárata C y coll1993). Así, el efecto del Glu bajo administración subcutánea a ratas podría representar un posible modelo en condiciones in-vivo para el estudio de los mecanismos involucrados en la susceptibilidad a dano citotóxico que poseen algunas neuronas del SNC, que permitan esclarecer problemas semejantes con algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer en el humano, donde se observa una perdida neuronal colinérgica, mostrando este mismo efecto en los modelos experimentales manipulados farmacologicamete. Sin embargo, es importante resaltar que la gran mayoría de los estudios encaminados a conocer los mecanismos involucrados en el dano neurocitotóxico se han realizado en condiciones in-vitro y con el uso de rebanadas de tejido nervioso ó con cultivo de neuronas. Por lo que en el presente trabajo se realizó con el propósito de ampliar el conocimiento sobre éstos mecanismos del sistema colinérgico cuantificando la actividad enzimatica CAT durante la fase adulta de la rata.



### III.- H I P O T E S I S.

Si el efecto citotóxico producido por la administración neonatal del Glutamato en ratas adultas afecta el sistema colinérgico luego entonces la actividad de la colina acetiltransferasa (E.C.2.3.1.6.) se reducirá en las neuronas colinérgicas de la corteza frontal , cuerpo estriado, hipocampo y núcelos basales de Meynert.

#### **IV.- OBJETIVO GENERAL:**

Determinar el efecto del Glutamato administrado neonatalmente sobre la actividad de la CAT en diferentes regiones del SNC y durante el desarrollo de la fase adulta de la rata.

#### **OBJETIVO PARTICULAR:**

Determinar la actividad de la colina acetiltransferasa en corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo y núcleos basales de Meynert en ratas tratadas con Glutamato a las edades de 30, 60 y 90 días.

## V.- MATERIALES Y METODOS

### Animales.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizarón ratas recién nacidas de la cepa Wistar, las cuales fueron mantenidas en condiciones de bioterio, esto es, con acceso libre al agua y alimento, ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas, humedad relativa 45% y temperatura de 25°C.

### Procedimiento Experimental.

Se trabajó con camadas de ratas recién nacidas, una de las cuales se tomó como grupo experimental y las otras dos como grupo testigo. Al grupo experimental se le administró L-Glutámico como sal monosódica (GMS) por vía subcutánea, a una dosis de 4 mg/g de peso en un volumen de 200  $\mu$ l de agua desionizada, esto a las edad de 1,3,5 y 7 días posnatal. Al grupo testigo se le administró una solución de cloruro de sodio en una concentración equimolar (SENaCl) a la del L-GMS y un tercer grupo se conformó por animales intactos. Los animales de cada grupos fueron sacrificados a la edad de 30, 60 y 90 días.

### Preparación del Tejido.

Una vez que los animales cumplieron la edad preestablecida fueron sacrificados por decapitación y sus cerebros fueron inmediatamente removidos y disectados en frío (4°C) para obtener las siguientes regiones: corteza frontal; cuerpo estriado; hipocampo y nucleos basales de Meynert. El tejido se pesó en una balanza analítica y se homogenizó en 1 ml de solución de sacarosa 0.25 M (4°C), se congelaron y se mantuvieron a -20 °C para su posterior procesamiento.

### Determinación de la Actividad de la CAT.

La actividad de la CAT se determinó por el método de Fonnum (1975) que brevemente consistió en lo siguiente: para

iniciar el ensayo, las muestras fueron descongeladas y el tejido se diluyó en sacarosa 0.25 M y posteriormente en una solución de sacarosa triton x-100, 0.2%.

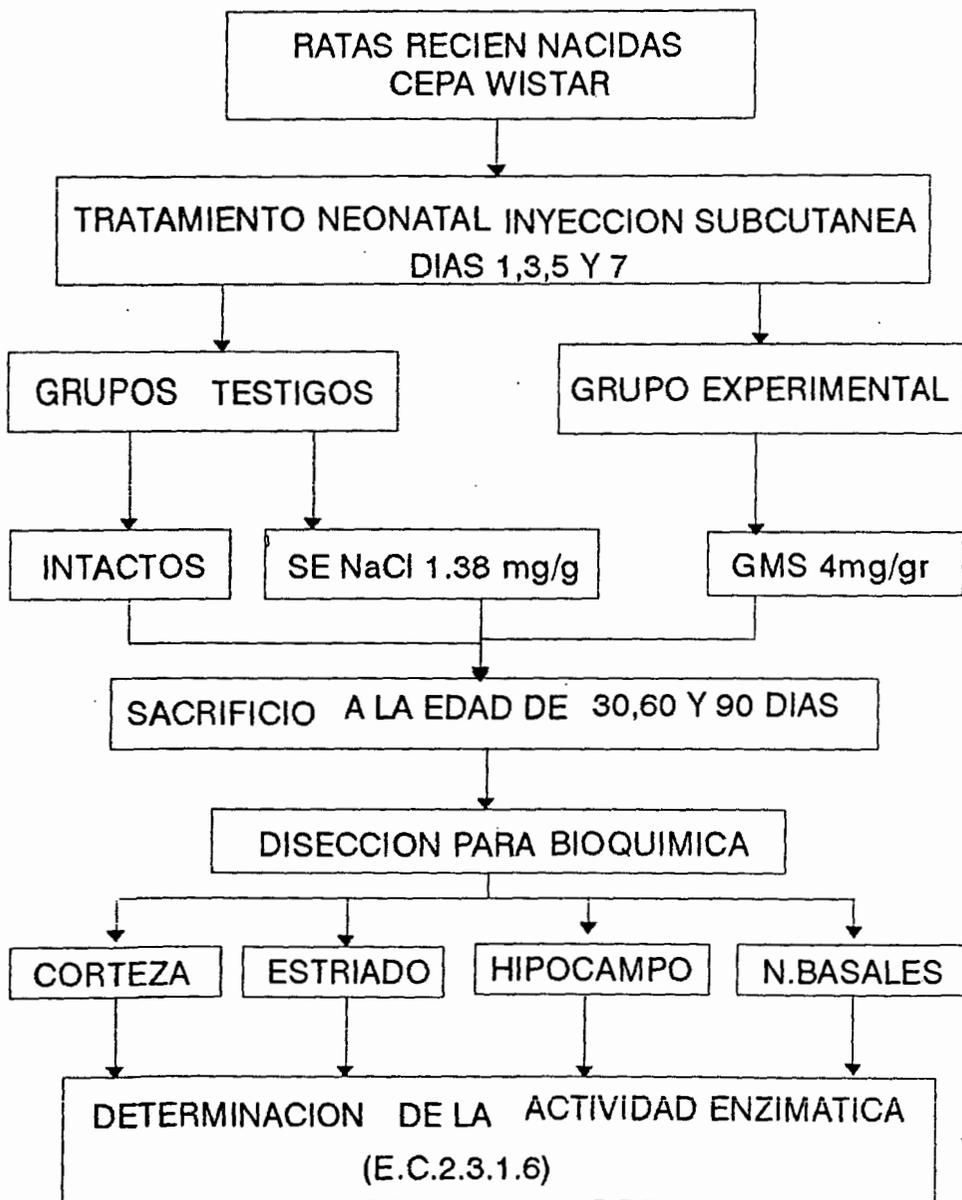
Para el ensayo se tomarón 15  $\mu$ l de cada muestra de tejido colocándose en un tubo de ensayo (800  $\mu$ l de capacidad) que se preincubó por 30 seg en un baño a 37°C, luego de la cual se agregaron 15  $\mu$ l de la mezcla del sustrato que contiene [<sup>3</sup>H] Acetil CoA 3  $\mu$ M (Act. esp 1.0 ci/mmOl ), KCl 2 M, Cloruro de colina 200 mM, EDTA 4 mM, eserina 1 mM (inhibidor de acetil-colinesterasa), albúmina de suero de bovino 10 mg/ml, amortiguador de fosfato de sodio 200 mM, pH 7.4, esta mezcla se incubó nuevamente durante 20 minutos.

Los testigos se realizaron con 15  $\mu$ l de sacarosa en lugar del tejido, se les adicionó 15  $\mu$ l de la mezcla de sustrato. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron retiradas e inmediatamente se lavaron con 2 ml de amortiguador de fosfato 10 mM pH 7.4, para detener la reacción. Finalmente, el contenido de los tubos se depositó en viales que contenían 1 ml de Kalignost/ acetronitrilo (250 mg/ 50 ml) y se les agregó 5 ml de tolueno puro para separar la mezcla en dos fases. A continuación los viales fueron agitados durante 30 segundos para separar las dos fases, se tomaron 2 ml de la fase orgánica (superior) y fueron colocados en otro vial al cual se agregaron 5 ml de líquido de centelleo para cuantificar la radiactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000. La actividad de la CAT se expresa en pMoles de acetilcolina por mg de proteína por hora. La cantidad de proteína presente se determinó a partir de la primera dilución del tejido en sacarosa por el método de Lowry. Para determinar la actividad específica de la CAT, se utilizó una segunda dilución del tejido para obtener la concentración de proteína requerida en la reacción enzimática (sacarosa tritón X-100 al 2%).

**Estadística**

Los resultados se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) con el uso de un programa de computo denominado SPSS y con las pruebas no paramétricas de una cola.

# DIAGRAMA EXPERIMENTAL



## VII.- R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en en el presente trabajo sobre la actividad de la CAT se muestran por regiones a las edades de 30 60 y 90 días.

### **Corteza Frontal**

Los resultados muestran que el tratamiento de Glu durante la etapa neonatal de la rata induce una importante reducción en la actividad de la CAT en la corteza cerebral a los 30, 60 y 90 días de edad del 39%, 41%, y 23 % respectivamente en relación con el grupo testigo intacto (Fig 1), mientras que la administración equimolar de cloruro de sodio sólo se modificó la actividad de la CAT a los 60 y 90 días de edad con diferencia estadísticamente significativa en relación al grupo testigo (Fig 1). La comparación entre el grupo tratado con la solución equimolar de cloruro de sodio mostró una mayor actividad de la CAT a los 30 y 90 días de edad en relación al grupo tratado con glutamato (Fig. 1).

### **Cuerpo Estriado**

En esta región no se encontro diferencias significativas a la edad de 90 días en el grupo experimental con respecto al grupo testigo (NaCl) (Fig 2). Sin embargo, a los 30 y 60 dias de edad el tratamiento de Glu neonatalmente produce un importante incremento en la actividad de la CAT respecto al grupo testigo intacto (Fig 2), así como también bajo la administración de la solución equimolar de cloruro de sodio se observó éste incremento en relación con el grupo testigo (Fig. 2).

### **Hipocampo**

A la edad de 30 días se observó una disminución estadísticamente significativa en el grupo

experimentaltratado con Glu del orden del 61% y 46 % respecto a los grupos control intactos y tratados con la solución equimolar de cloruro de sodio respectivamente (Fig 3). Mientras que a los 60 y 90 días de edad, la actividad de la CAT no se modificó en ninguno de los grupos que recibieron tratamiento en relación al grupo testigo intacto (Fig 3).

#### **Núcleos Basales de Meynert**

A los 30 y 90 días de edad se observó una disminución estadísticamente significativa del orden del 53 % y de 30 % en la actividad de la CAT en el grupo experimental (GMS) respecto al grupo intacto respectivamente, en cuanto a la comparación entre el grupo tratado con cloruro de sodio continuo el aumento de actividad en un 25% respecto al experiemental a la edad de 90 días ( fig 4). mientras que a los 30 días no se presentaron cambios en la actividad de la CAT. En cuanto a la edad de 60 días no se presentaron cambios significativos en ninguno de los grupos que recibieron tratamiento con respecto al grupo control (Fig 4).

## VIII.- D I S C U S I O N

Un gran número de evidencias indican que el Glu es uno de los neurotransmisores excitatorios más abundantes e importantes del SNC. El Glu también puede inducir cambios en la morfología sináptica asociada a procesos de aprendizaje y memoria, estimula a la célula al grado que puede inducir degeneración de dendritas, hasta la muerte celular, lo que le confiere una participación muy importante en el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas (Mattson, M.P. 1989a), tales como el Alzheimer, Parkinson, Huntington, (Maragos, W.F y col 1987) epilepsia, (Sloviter, R.S 1983), entre otras. En algunos de estos problemas se ha demostrado que tanto el sistema GABAérgico como el colinérgico resultan ser los más vulnerables al efecto excitotóxico del Glu. En el caso del sistema colinérgico, la CAT ha sido uno de los parámetros utilizados para demostrar pérdida de neuronas colinérgicas en regiones que contienen tanto células como terminales colinérgicas. De ésta manera, se observa que la actividad de la CAT como índice de neurotransmisión colinérgica se modifica en forma importante en algunas enfermedades neurodegenerativas (Perry, E.K. 1986 y Ruberg, M. y col 1982a). Así, en el presente trabajo se determinó la actividad de la CAT en regiones del SNC que poseen aferencias glutamatérgicas; durante la fase adulta de la rata tratada neonatalmente con Glu. Los resultados muestran una importante disminución en la actividad de la CAT principalmente en la corteza frontal bajo el efecto del Glu en todas las edades estudiadas, y en los NBM a los 30 y 90 días, sin embargo en el estriado se observa un incremento en la actividad de la CAT a los 30 y 60 días de edad en los

grupos tratados respecto al intacto cuya diferencia es significativa, en el hipocampo sólo se observa reducción significativa a los 30 días de edad.

En este sentido, se pueden observar diferencias importantes en el efecto que posee el Glu en las diversas regiones de estudio, lo que denota evidentemente la presencia de receptores a Glu, y esto podría traducirse en un posible daño permanente de neuronas colinérgicas, particularmente en la corteza cerebral y en los NMB. Los NBM se consideran como el mayor origen de las proyecciones colinérgicas hacia la neocorteza de roedores, en esta región encontramos básicamente cuerpos neuronales y no terminales colinérgicas propiamente que es donde se concentra la enzima subcelular. Sin embargo, estudios realizados con la aplicación de ácido iboténico en ratones y por métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos se ha demostrado una pérdida de células colinérgicas que también se refleja en la actividad de CAT y ACE. (Bogdanovic, N. y col 1993). Aunque esta neurotoxina no es selectiva para el sistema colinérgico, se demuestra que cuando se lesiona con ácido quisquálico, ó AMPA induce una importante reducción en la actividad de CAT cortical. (Cannor, D.J., Langlais, P.J.1991 y Dunnett, S.B. y col 1991). Así, las diferencias que se observan bajo el efecto del Glu podrían explicarse bajo diferentes aspectos; la concentración de los aminoácidos excitatorios y sus efectos sobre otros neurotransmisores, número de sitios receptores, presencia de mecanismos de captura, etapa de desarrollo para la aplicación de la neurotoxina y su estudio, así como la presencia de aferentes a la región de estudio.

En este sentido, existen diversos estudios que muestran que el daño neuronal inducido en algunas regiones del SNC pueden estar relacionadas a la activación de los receptores postsinápticos de aminoácidos excitatorios (Jorgensen y ODiemer 1982., Rothman y Olney 1986., Choi 1988., Meldium y Ganthwarte 1991), particularmente por exceso de liberación de

Glu al espacio extracelular (Benveniste y col 1984., Butcher y col 1990., Graham y col 1990., Takagi y col 1993).

Uno de los mecanismos de dano propuesto y ampliamente documentado se refiere a la activación de los receptores a Glu tipo NMDA, ya que se ha demostrado que con la administración intracerebral de Glu y agonistas al Glu como NMDA y Quiscualico en ratas de 7 días de edad produce dano neurológico principalmente en corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado ( Richard, S.K y col 1991), por lo que posiblemente el dano sea permanente principalmente en corteza cerebral en la cual se observa mayores alteraciones morfológicas y bioquímicas, otro mecanismo puede ser posible, que durante desarrollo las células gliales maduren y sean capaces de capturar al Glu y transformarlo a glutamina aumentando su síntesis y provocando su liberación como Glu, así como la liberaciones de otros neurotransmisores tales como el GABA que provocan despolarización neuronal por exceso de concentración extracelular. (Mcilwain, H., Bachelard, H.S. 1985), ésto podría explicar la reducción de la actividad de la CAT, principalmente en corteza por el efecto neurotóxico de Glu, lo que posiblemente demuestra que la activación de los receptores a Glu pueden estar involucrados en el dano neuronal inducido por el efecto toxico de los neurotransmisores desde los 21 días de edad (Garza, B.F. 1993), hasta la etapa adulta (90 días) en corteza cerebral.

Por otro lado, el sistema glutamatérgico y el colinérgico interactúan en eventos de plasticidad sináptica que se consideran responsables de los procesos de aprendizaje y memoria por lo que la vulnerabilidad de las neuronas colinérgicas puede deberse a la densidad relativa de los diferentes tipos de receptores a Glu, sin descartar la participación de otros neurotransmisores, así como a los diferentes sistemas de traducción de senales por los receptores en particular de aquellos que se activan por excesiva concentración de Glu.

El hipocampo en particular es una región que ha recibido mucha atención en cuanto a la susceptibilidad neurotóxica que presenta ante la interacción del sistema glutamatérgico y colinérgico, así como por su participación en algunos procesos cognoscitivos, de aprendizaje y de memoria (Isaacson, R.L y Pribram, K.H 1975). Así, el efecto del Glu que se observa en el hipocampo sobre la actividad de la CAT a los 30 días de edad, pero no a los 60 y 90 días de edad, podría indicar que las células colinérgicas del hipocampo no son afectadas en forma permanente por el Glu, al menos en la edad adulta, a diferencia de lo que se observa en los NBM y en la corteza cerebral, ya que resultados previos de nuestro laboratorio demuestran una disminución de unión de [<sup>3</sup>H]QNB a receptores muscarínicos a los 21, 30 y 60 días de edad, e importantes daños en el área CA1, CA2 en hipocampo. (Beas-Zarate C y Ortuno S.D 1993), lo que sugiere que las células blanco del Glu en el hipocampo no son colinérgicas. En este sentido, existen estudios *in-vitro* en cultivo de neuronas hipocámpales que demuestran que la acetilcolina potencia la neurodegeneración inducida por Glu y que ésta es mediada por receptores muscarínicos, lo que demuestra que las células piramidales poseen éste tipo de receptores (Mattson 1989b). Así también, el NMDA no modifica la actividad de la CAT en células colinérgicas del hipocampo, lo que apoya la posibilidad de que la neurotoxicidad del Glu no involucra inicialmente lesión sobre células colinérgicas, sanfeliu y col,(1990) y también, Kudo y col.(1988) demostraron que la activación de los receptores muscarínicos en cultivo de neuronas hipocámpales incrementa la liberación de Ca<sup>++</sup> intracelular por lo que AC puede potenciar el aumento de Ca<sup>++</sup> extracelular para generar la toxicidad de Glu.

Por otro lado, estudios post-mortem demuestran que la actividad de CAT se reduce en humanos con Alzheimer, sin embargo en este mismo estudio también se demuestra que los sitios de unión de acetilcolina a su transportador de

vesículas sinápticas no se modifica, sino por el contrario se incrementan por encima del control (Ruberg. M., Mayo. W., Brice.A., y col 1990). Estas discrepancias también se han encontrado en la unión de vesamicol, ligando del transportador de acetilcolina, en hipocampo y corteza cerebral, lo que sugiere un diferente grado de lesión ó al desarrollo de un mecanismo compensatorio de las neuronas colinérgicas que sobreviven a un efecto secundario del Glu sobre éstas, sin embargo, la actividad de CAT se reduce en estas condiciones, lo que podría indicar que la síntesis de CAT también se afecta en estas neuronas colinérgicas, pero sin modificar aparentemente el número de sitios de unión para acetilcolina (transportador vesicular de acetilcolina).

Por otro lado, en el cuerpo estriado en los dos primeros meses encontramos aumento de la actividad en los grupos que se trataron con NaCl en relación al grupo intacto (fig 2). Esto sugiere que algunas neuronas colinérgicas son sensibles a cambios en la osmolaridad del medio por el NaCl. En este sentido, estudios realizados *in-vitro* con cultivo de neuronas se ha demostrado que la despolarización con KCl 40mM, incrementa la actividad de CAT en un 50% en relación al grupo testigo (Coral Sanfeliu y col 1990), por lo que el aumento en la actividad de la CAT en estas condiciones podría ser una respuesta temporal a la capacidad enzimática ó bien a un aumento en la síntesis de proteína enzimática de las células colinérgicas lo que sería interesante demostrar con estudios posteriores.

## IX.- CONCLUSIONES

1.- El tratamiento neonatal con Glu induce una disminución en la actividad de la CAT en la corteza cerebral y los núcleos basales de Meynert a lo largo de todas las edades estudiadas.

2.- El NaCl administrado en una concentración equimolar a la del Glu, modifica de forma inespecífica la actividad de la CAT en todas las regiones durante las diferentes edades estudiadas, probablemente por un efecto hipertónico del mismo.

3.- El aumento en la actividad de la CAT que se observó en el cuerpo estriado a los 30 y 60 días de edad en los grupos tratados con NaCl y Glu, puede representar un incremento en la eficiencia sináptica de terminales colinérgicas, posiblemente como consecuencia de un mecanismo de plasticidad de corto plazo.

4- La susceptibilidad de las neuronas colinérgicas al efecto neurotóxico del Glu depende de la etapa del desarrollo, así como de la región en estudio.

## BIBLIOGRAFIA.

Atack , J.R., Perry, E. K., Perry, R.H., Tomolinson, B.E., Blessed, G. y Fairbain, A.(1983) Greenfield 1984., Smith y Cuello (1984). en : Brain cholinergic enzymes and cortical EEG activity in young y old rats. (J. Sirvio., A. pitkonen., A. Paakkonen., J Partanen y P. J Riekkinen 1989). Con. biochem. physiol. vol 94C, No 1, pp 277-283.

Beas-Zarate, C., Ortuno, S. D., Garza. B. F (1993). Caracterización del glutamato monosodico sobre el desarrollo del sistema colinérgico en la rata.

Benveniste, H., Drejer, J., Schosboe, A y Diemer, N.H (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J. Neurochem. 43, 1369-1374.

Benveniste H., Drejer, J., Schousboe, A., y Diemer, N.H. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J. Neurochem. 43, 1369-1374.

Bogdanovic, N., Islam. A., Nilsson. L., Bergstrom. L., Winblad. B., Adam. A. (1993). Effects of nucleos basales lesion on muscarinic receptor subtypes. Experimental, Brain Res. 97, 225-232.

Butcher, S.P., Bullock, R., Graham, D.I., y McCulloch, J.(1990). Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. Stroke, 21, 1727-1733.

Butcher, S. P., y Hamberger, A. (1987). in vivo studies an the extracellular, and veratrine, releasable, pools of endogenous amino acids in the rat striatum: effects of corticostriatal deafferentiation and kainic acid lesion. J.Neurochem, 48, 713-721.

Candy, J. M., Perry, E. K., Irving D., Blasted, G., Fairbairn, A. F., y Tomlinson B. E. (1983). Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Journal, Neurol. Sci. 54, 277-289.

Cannor, D.J., Langlais. P.J. (1991). Behavioral impairments after lesions of the nucleos basales by ibotenic acid and quisqualic acid. Brain Res. 555, 84-90.

Colome López, A.M. (1983). Acido glutámico y aspártato, en: Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas.( Herminia Pasantes-Morales y Hugo Aréchiga). Eds. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cooper. J.R; Bloom. F.R., Roth R. H. (1982). The biochemical basis of neuropharmacology. 4ta eds. Oxford University Press. U.S.A. pp. 77-108.

Coral, Sanfeliu, Anthony. H y Ambrish. J.P. (1990). Death of subcortical cholinergic neurons in certain neurodegenerative disorders may not be due to an overstimulation of N-methyl- D- aspartate receptors. Brain Res. 506, 319-322.

Coyle, J. T., Murphy, T. H., Puttfarcken, P. S., Lyons, E. W.L y Vornov, J. J. (1991). The non-excitatory mechanisms of glutamate induced neurotoxicity. **Epilepsy Res.** 10, 41-48.

Changeux, J. P., Deviler-Thierry, A., y Chemvilli, P. (1984). Acetylcholine receptor; an allosteric protein. **Science.** 25, 1335-1345.

Choi. (1988). en: plasticity and regeneration of the nervous system (ndvances in experimental medicine and biology). Paolas, Timeras, Alain, P, Ezlo, G., Jean, L., y Antonio, V. ed) **Plenum Press. New York y London** 1990. pp 165-179.

Choi, D.W.(1988). Glutamate neurotoxicity and disease in the nervous system. **Neuron** 1, 623-634.

Dale. H.H. (1914). The action of certain esters and ether of cholina, and their relation to muscarine. **J. of pharmacol and Exper. Therapeutics.** 6, 147-90.

Dunnett, S.B., Evertt, B.J., Robbins, T.W.(1991). The basal forebrain cortical cholinergic system: interpreting the funcional consequences of excitotoxic lesions. **Trends Neurosci.** 14, 494-501.

Duobois B., Ruberg M., Javoy- Agid, F., Ploska A., y Agid Y. (1983). A subcortico-cortical cholinergic system is affected in Parkinson's disease. **Brain Res.** 288, 213- 218.

El-Fakahany, E.E; Alger, B.E; Lai, W.S; y col (1988). Neuronal muscarinc responses: role of protein Kinase C. **FASEB. Journal.** 2, 2575-83.

Garza, B.F y Ortuno, S.D. Tesis Lic en Biología Fac Cs. Biológicas U. de G. Reg. 081298661. Sep (1992)

Globus, M. Y.-T., Busto, R., Dietrich, W.D., Martinez, E., Valdes, I., y Ginsberg, M.D (1988) Effect on isquemia on the in vivo release of stratal dopamine, glutamate,  $\delta$ -aminobutryric acid studed by intracerebral microdialysis. J. Neurochem. 51, 1445-1464.

Graham. S.H., Shiraishi, K., Panter, S.S., Simon, R.P., y Faden, A.I. (1990). Changes in extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia. Neurosci. Lett. 110, 124-130.

Hammer, R., Berrie, C.P., Birdsall N J M., Burgen Asu., Hulme E, C (1980). Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. Nature. 283, 90-92.

Hulme, E.C., birdsall, N.J.M., Buckley, N.J (1990) Muscarinic receptor subtypes. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 30, 633-673.

Isaacson, R.L. y Pribram, K.H (1975).The hippocampus. (Eds) Vols. I and II Plenum. New York. pp 1-120

Jorgensen, M.B y Diemer, N.H. (1982) Selective neuron loss after cerebral isquemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. Acta Neurol . Scand. 66, 536-546.

Keinanen, K., Wisden W., Sommer, B., Wwrnwr, P., Herp, A., Verdoorn, T. A., Sakmann B., y Seeburg, P. H. (1990). A family of AMPA-selective glutamate receptors. Science 249, 556-560.

Kellar, K.J., Martino, A. M., Hall, Jr. DP., Schwartz, R.D., Taylor, R.L (1985). High affinity binding of [<sup>3</sup>H] acetylcholine to muscarinic cholinergic receptors.

J. Neurosci. 30, 633-673.

Krebs, H. A. (1935). Metabolism of amino acids. IV. Synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissue. J. Biochem.

29, 1951-1969.

Kudo, Y., Ogura, A., y Lijima, T. (1988). Stimulation of muscarinic receptor in hippocampal neuron induces characteristic increase in cytosolic free Ca. Neurosci. Lett.

85, 345-350.

Kuhar, M.J. (1976). The anatomy of cholinergic neurons. In biology of cholinergic function. Eds. A.N. Goldberg and I. Hanin. Raven Press, New York. pp.3-27.

Kupfermann, I. 1979; Bloom 1988; Mtson 1988; Nicoll 1988; Strange 1988; El -Fakahan y col 1988. Morphological organization of cholinergic systems. en Brain cholinergic systems ( M. Steriade y D. Biesold 1990 ed). Oxford science publications . p.p 63, 103.

Laguna, J., Pina, G.E., 1988. Bioquímica. Edición científica, 4ta. eds La prensa medica Mexicana, S.A de C.V 1988.

Lechéricy, S., Hirsch, E.C., Cervera, P., Hersh, L. B., Hauw, J.J., y col (1989). Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum of patients with AD. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 8580-8584.

Lehéricy, S., Etienne, C. H., Louis, B.H y Yves Agid. (1991 a). Cholinergic neuronal loss in the globus pallidus of Alzheimer's disease patients. Neurosci. Lett. 123, 152- 155.

Lechéricy, S., Hirsch, E. C., Hersh, L. B. y Agid Yves (1991). Cholinergic neuronal loss in the globus pallidus of Alzheimer disease patints. Neurosci. Lett. 123, 152- 155.

Levey, A. I., y Wainer, B. H., (1982). Cross-species and intraspecies reactivities of monoclonal antibodies against choline acetyltransferase. Brain Res. 234, 469-73.

López Antúnez. (1983) Anatomía funcional del Sistema Nervioso, ed.LINUSA., México, pp 5-633.

Lucas, D. R., y Newhouse, J. P. (1957). The toxic effect of sodium glutamate on the inner layers of hte retina. Arch. Ophthalmol. 158, 193-201.

Manter y Gatz's (1987). Essentials of clinical neuroanatomy and neurophysiolgy (Sid Gilman Sarah Winans Newman ) edt 7 F.A Davis company. pp 1-223

Maragos, W.F., Greenamyre, J.T., Penney, J.B y Youg, A.B., 1987. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. Trends Neurosci. 10, 65-68.

Mattson, M.P. (1988). Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. Brain. Res. 472, 179-212.

Mattson, M.P. (1989). Acetylcholine potentiates glutamate-induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons. Brain Res. 497, 402-406.

Mattson, M.P. (1989a). Acetylcholine potentiates glutamate-induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons. Brain Res. 497, 402-406.

Mattson, M.P., y Kater, S.B. 1989. Excitatory and inhibitory neurotransmitters in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. Brain Res. 478, 337-348.

McIlwain, H., Bachelard, H.S (1985). Biochemistry and the central nervous system. Churchill Livingstone, London. pp, 168-178.

Meldrum, B.S, y Garthwaite, J. (1991). Excitatory amino acids neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol. Sci. Special Report. 54-61.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Levey, A.I y Wainer, B. H. (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. J. of comp. neurol. 214, 170-97.

Mc Geer, P. L., Eccles, J. C., y Mc Geer, E. G. (1987). Amino acid neurotransmitters, en: Neurochemistry basic (Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R. W. y Molinoff, P., eds), 4ta. ed., Raven press, New York. pp. 311-332.

Nachmansohn, D., y Machado, A. L. (1943) The formation the acetylcholine, A new enzyme; choline acetylase. J. of Neurophysiol. 6, 397- 403.

Nagai, T., Mc Geer, P.L., Peng, J. H., Mc Geer, E.G. y Dolman, C. E. (1983). Choline acetyltransferase immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls. Neurosci. Lett. 36, 195-199.

Nicoll, R. A. (1988). The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. Science. 241, 545-51.

Noback, C.R. y Robert, J.D. (1980). Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología, ed. McGraw Hill, México. pp 1-421.

Numa, S., Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosoto, M., y col. (1983). Molecular structure of the acetylcholine receptor. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 48, 57-69.

Olney, S. W. (1969). Glutamate induced retinal degeneration in neonatal mice: electron microscopy of the actively evolving lesion. Science 164, 719-721.

Olney, J. W. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids, en: kainic acid as tool in neurobiology. McGeer, E., Olney, J. (eds) New York: Raven press. pp. 95-121.

Olney (1971). Glutamate induced necrosis in the infant mouse hypothalamus. J. Neuro pathol. Exp. Neurol. 30, 75-90.

Park, D. H., Ross, M. E., Pickel, V. M., Reis, D. J., y Jon, T. H (1982). Antibodies to rat choline acetyltransferase for immunochemistry and immunocytochemistry. Neurosci. Lett. 34, 129-35.

Perry, E.K. (1986). The cholinergic hypothesis-ten yearson. Br. Med. Bull. 42, 63-69

Richard, S.K., Young., Ognen, A.C.P., William, J.A., y Johnnie Y. (1991). Effects of glutamate, quisqualate, and N-Methyl-D-aspartate in neonatal brain. Experimental Neurol. 111, 362-368.

Robison, M. B., y Coyle, J. T., (1987). Glutamate and realated acidic excitatory neurotransmitters: From Basic Science to clinical application FASBJ. 1 446-455.

Rothman, S.M y Olney, J.W. (1986).Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. Ann. Neurol. 19, 105-111.

Ruberg, M., Ploska, A., Javoy-Agid, F., y Agid, Y. (1982). Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in parkinsonian subjects with reference to dementia. Brain Research. 232, 129-139.

Ruberg, M., Ploska, A., Javoy-Agid, F., Y agid, Y. (1982a). Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in Parkinsonian subjets with reference to dementia. Brain Research 232, 129-139.

Ruberg. M., Mayo. W., Brice. A., Ouyckaerts. C., Hauw. J.J., Simon. H., Lemoal. M., Agid. (1990). Choline acetyltransferase activity and [3H] vesamicol binding in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease Parkinson's disease, and rats with basal forebran lesions. Neuroscience. 35, No 2. 327-333

Rye, D. B., Wainer, B. H., Mesulam, M. M., Mufson, E. J., y Saper, C.B. (1984). Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde

tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. Neuroscience, 13, 6270-43.

Sandberg, S., Butcher, S.P., y Hagberg, H., (1986). Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia in in vivo dialysis of the rat hippocampus. J. Neurochem. 47, 178.

Saper, C. B. (1984) Organization of cerebral cortical afferent system in the rat. I. Magnocellular basal nucleus. J. of comp. Neurol. 222, 313-42.

Shilibs. R., Beas-Zarate C. (1990). Receptores colinérgicos en el cerebro de mamíferos. Ciencia, 41, 287-296.

Shute, C. C. D. y Lewis, P. R. (1967). The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. Brain Res. 90, 497- 520.

Shute, C. C. D., y Lewis, P. R. (1967). The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. Brain Res. 90, 497-520.

Sloviter, R.S., "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies. Brain Res. Bull. 10, 675-697.

Sommer, B. y Seeburg, P.H (1992). Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. Trends Pharmacol. Sci 13, 291-196.

Takeuchi, A. y N, Takeuchi (1964) " The effect on Crayfish muscle of iontophoretically applied glutamate" en

aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. (Herminia Pasantes-Morales y Hugo Aréchiga. Universidad Nacional Autónoma de México 1988.

Takagi K., Ginsberg M.Y-T., Dietrich W.D., Martinez E., Kraydieh S., y Busto R. (1993). Changes in amino acid neurotransmitters and cerebral blood flow in the ischemic penumbral region following middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation with histopathology. J. Cereb. Blood Flow Metab. 13, 575-585.

Taylor P., y Brown, H. J (1994). Acetylcholine en: Basic Neurochemistry( George J.S., Bernard, W. A. R., Wayner A, Perry, B. M, P., eds), Sta. ed., Raven Press New York.

Waelsch, H. (1951). Glutamic acid and Cerebral function. Advan. protein chem. 6, 299-341.

Wainer, B.H., Levey, A. I., Mufson, E.J., y Mesulam, M. M. (1984). Cholinergic systems in mammalian brain identified with antibodies against choline acetyltransferase. Neurochemistry International. 6, 163-82.

Wainer, B. H., y mesulam, M. M. (1990). Ascending cholinergic pathway in the rat brain. en: Brain cholinergic systems. ( Steriade, M. y Besold, D ., eds) Oxford University Press, New York. pp. 65-119.

Watson, M., Yamamura, H., Roeske, W.R. (1983). A unique regulatory profile and regional distribution of [<sup>3</sup>H] Pirenzepine in the rat provide evidence for distinct M1 y M2 muscarinic receptor subtypes. Life Sci. 32, 3001-3011.

Watson y col 1985., Mash y col 1985., Mash y potter 1986., Vogt 1988., Aubert y col 1992. en Effects of nucleus

basales lesion on muscarinic receptor subtypes.( Nend Bogdanovic, Atiqul Islam, Lars Nilsson., Lena bergstrom., Bengt Winblad, Abdu Adem (1993) Ex. Brain Res. 97, 225-232.

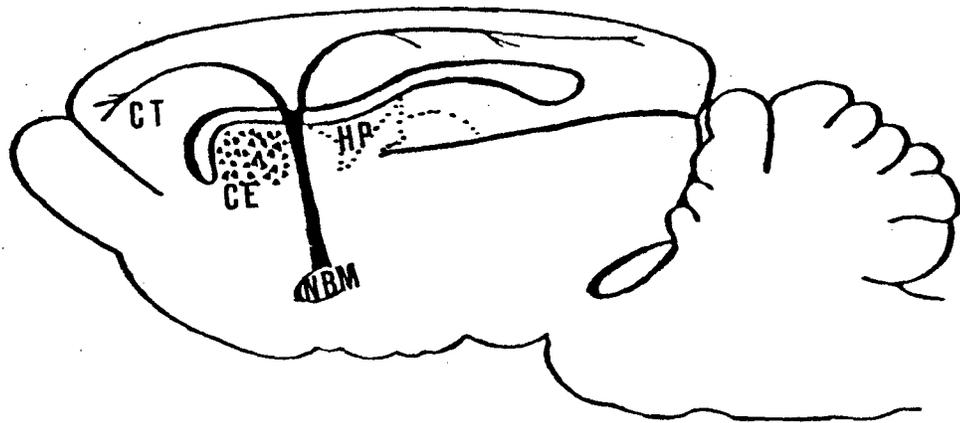
Witehouse, P. J., Hedreen, J. C., White, C. L. III, y Price, D. L. (1983). Basal forebrain neurons in the dementia of Parkinson's disease. Ann Neurol. 13, 243- 248.

RELACION DE FIGURAS Y GRAFICAS

## F I G U R A 1

ESQUEMA ILUSTRATIVO DE LAS REGIONES DE  
ESTUDIO EN LA RATA.

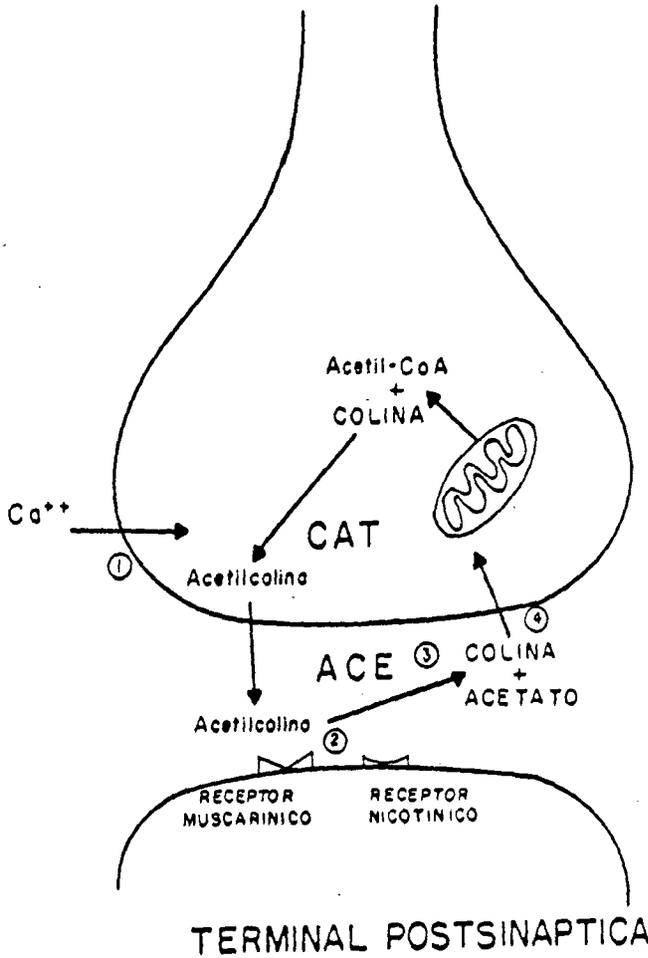
Corteza cerebral (CT); Cuerpo estriado (CE);  
Hipocampo (HP); Núcleos basales de Meynert (NBM)



F I G U R A 2  
TRANSMISION COLINERGICA.  
(Tomado de Garza y Ortuño, 1993)

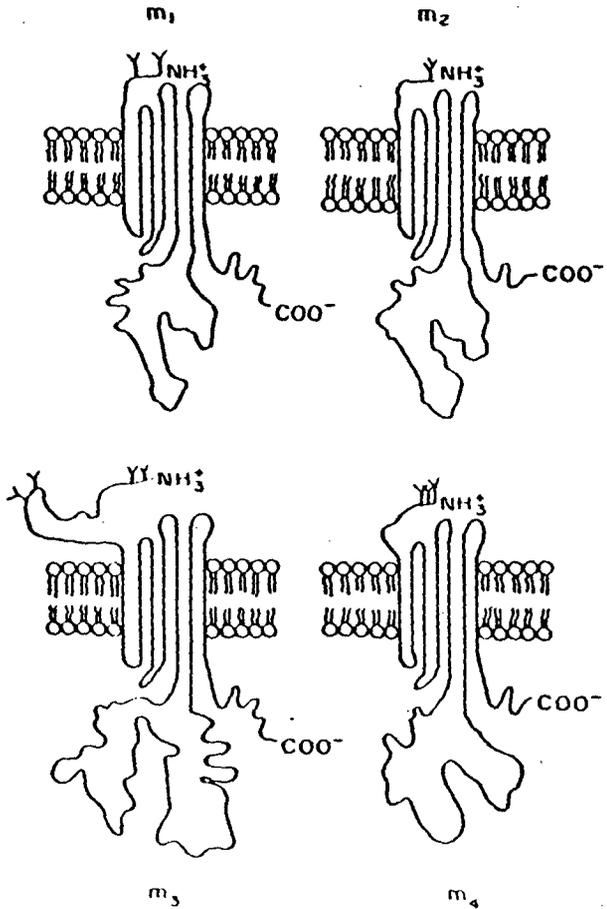
- 1.- La liberación de AC requiere de  $Ca^{++}$  extracelular, el cual entra a la neurona cuando ésta es despolarizada.
- 2.- Una vez en el espacio sináptico, la AC se combina con el receptor postsináptico, que puede ser de dos tipos: nicotínicos o muscarínicos.
- 3.- El mecanismo de eliminación de la AC del espacio intersináptico está relacionado con la actividad hidrolítica la ACE.
- 4.- Una vez hidrolizada la AC, alrededor de un 35 a 50 % de la colina libre es transportada de regreso a la terminal presináptica para ser reutilizada en la síntesis de nueva AC.

# TERMINAL PRESINAPTICA

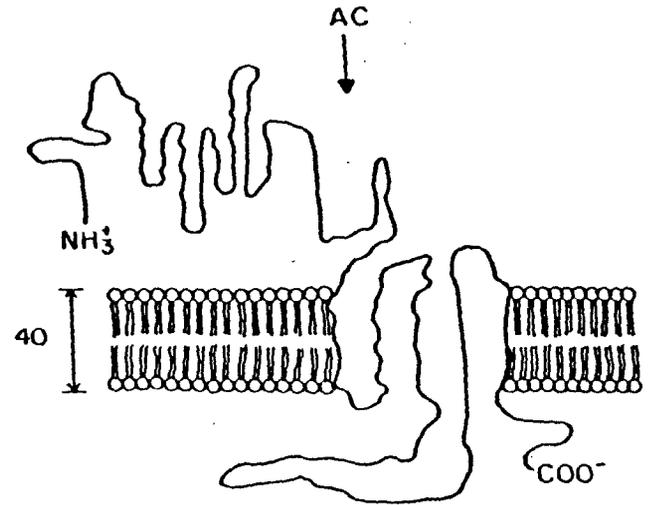


**F I G U R A 3**  
**PRINCIPALES TIPOS DE RECEPTORES A ACETILCOLINA**  
**EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMIFEROS**

# Subtipos de receptores muscarínicos



# Modelo del receptor nicotínico

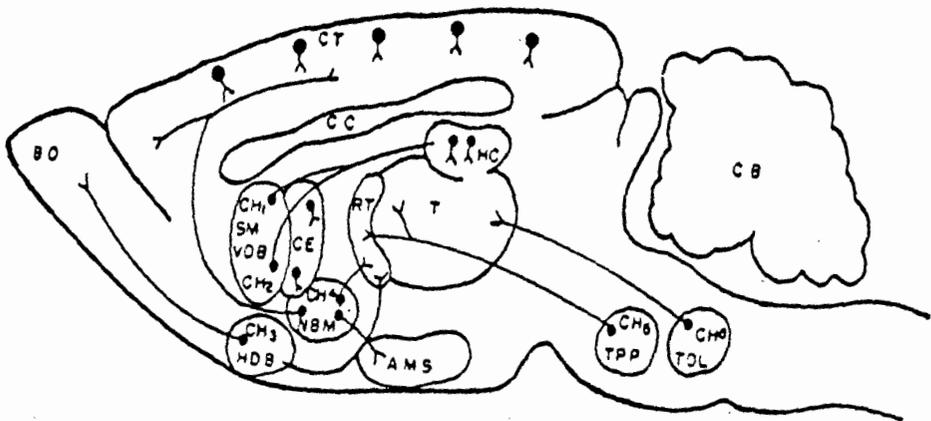


## F I G U R A 4

## PRINCIPALES VIAS COLINERGICAS EN EL CEREBRO DE LA RATA

Las designaciones CH1-CH6 identifican grupos de neuronas colinérgicas contenidas dentro de varios núcleos del cerebro anterior y tronco crebral.

Abreviaciones: **(AMG)** amígdala; **(CB)** cerebelo; **(CC)** cuerpo calloso; **(CE)** cuerpo estriado; **(CT)** corteza; **(HDB)** núcleo límbico horizontal de la banda diagonal de broca; **(HC)** hipocampo; **(TDL)** núcleo tegmental dorsolateral; **(SM)** núcleo medio septal; **(NBH)** núcleo basal de Meynert; **(BO)** bulbo olfatorio; **(TPP)** núcleo tegmental pendunculopontino; **(T)** talamo; **(RT)** núcleo reticular talámico; **(VDB)** núcleo límbico vertical de la banda diagonal de Broca. Las interneuronas colinérgicas se muestran esquemáticamente en CT, HC, y CE.



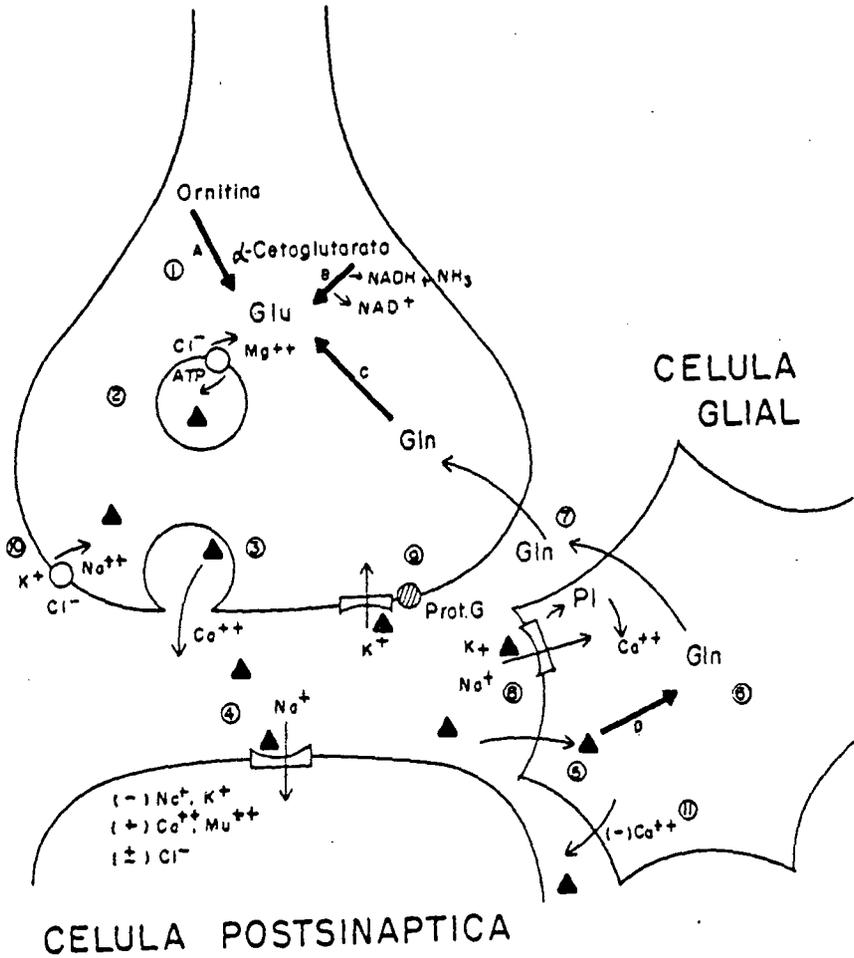
## F I G U R A 5 .

(Tomado de Ortuno Sahagun D)

## ESQUEMA DE LA NEUROTRANSMISION GLUTAMATERGICA.

- 1    PRINCIPALES VIAS DE SINTESIS
- 2    CAPTURA DE ALTA AFINIDAD EN VESICULAS
- 3    LIBERACION DE VESICULAS
- 4    UNION A DIFERENTES TIPOS DE RECEPTORES
- 5    CAPTURA DE BAJA AFINIDAD EN CELULAS GLIALES
- 6    CONVERSION A GLUTAMINA
- 7    LIBERACION Y CAPTURA DE GLUTAMINA
- 8    RECEPTORES EN GLIA
- 9    RECEPTOR PRESINAPTICO
- 10  CAPTURA POR LA TERMINAL PRESINAPTICA
- 11  LIBERACION TONICA POR CELULAS GLIALES

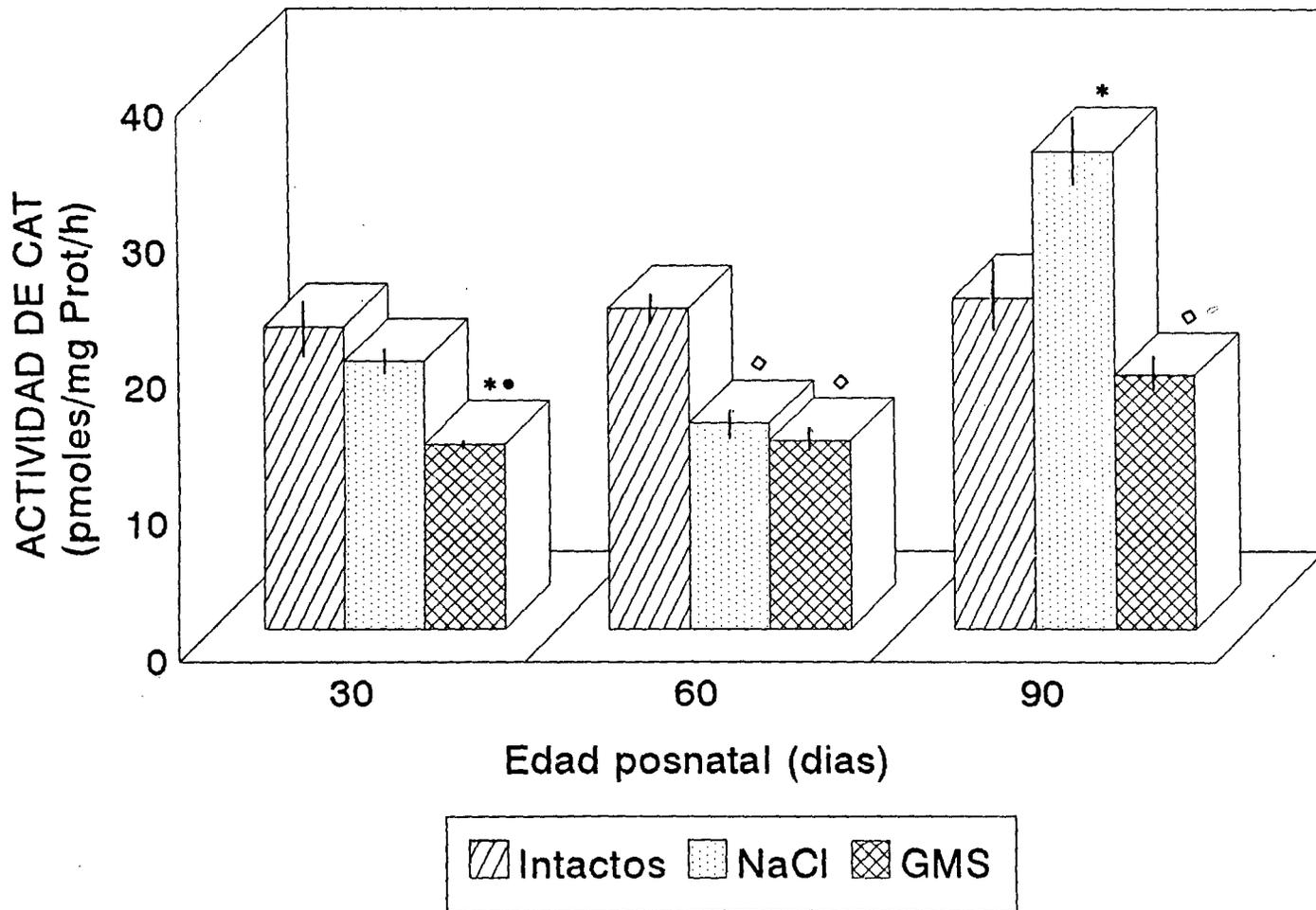
# TERMINAL SINAPTICA



**GRAFICA 1**

Actividad de CAT en corteza cerebral en ratas intactas y tratadas con NaCl y GMS a diferentes edades. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar,  $\bullet$   $p < 0.001$ ,  $*$   $p < 0.05$ ,  $\diamond$   $p < 0.005$  de 4-6 experimentos por duplicado.

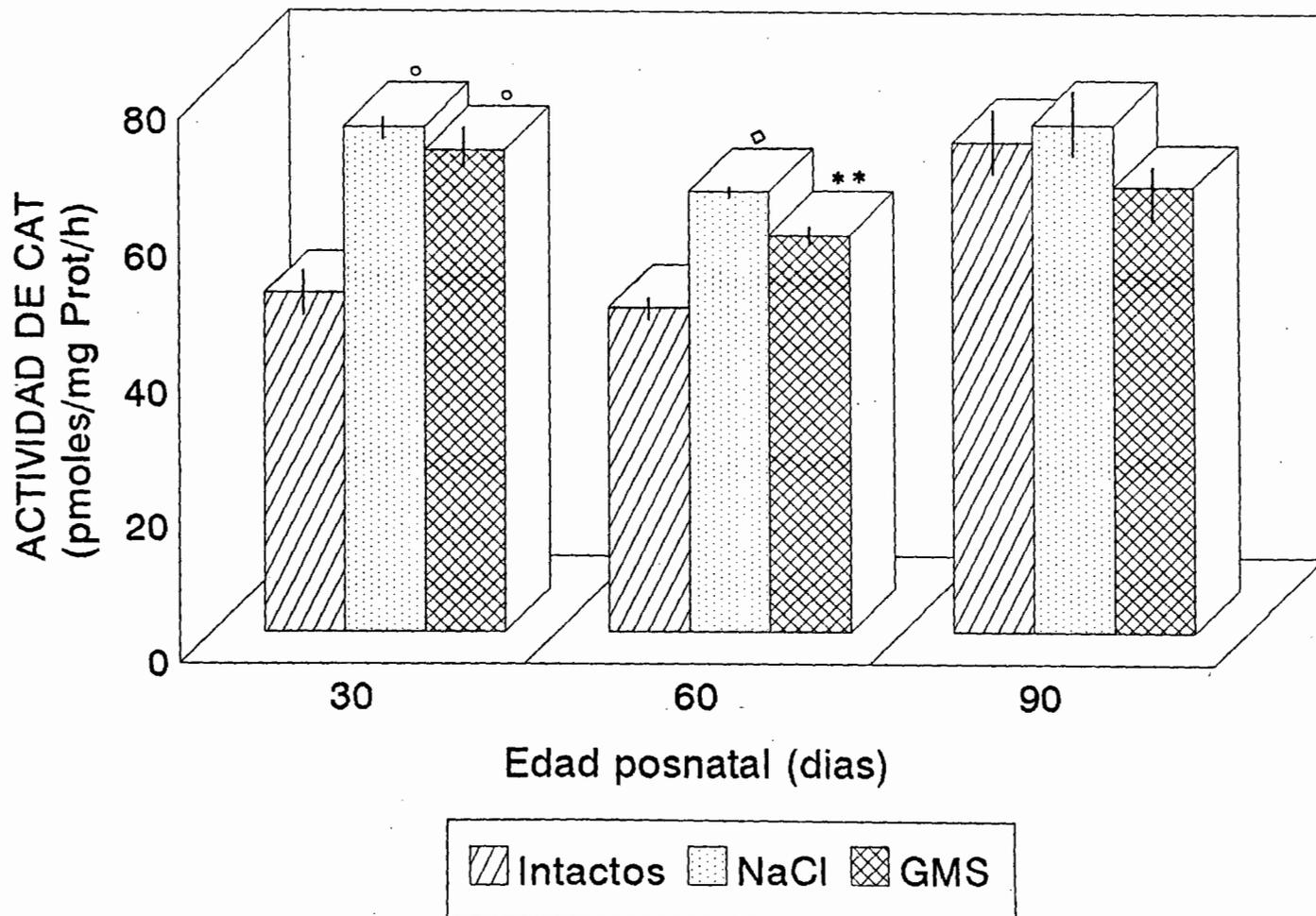
# CAT EN CORTEZA CEREBRAL



**GRAFICA 2**

Actividad de CAT en cuerpo estrado en ratas intactas y tratadas con NaCl y GMS a diferentes edades . Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$  de 4-6 experimentos por duplicado.

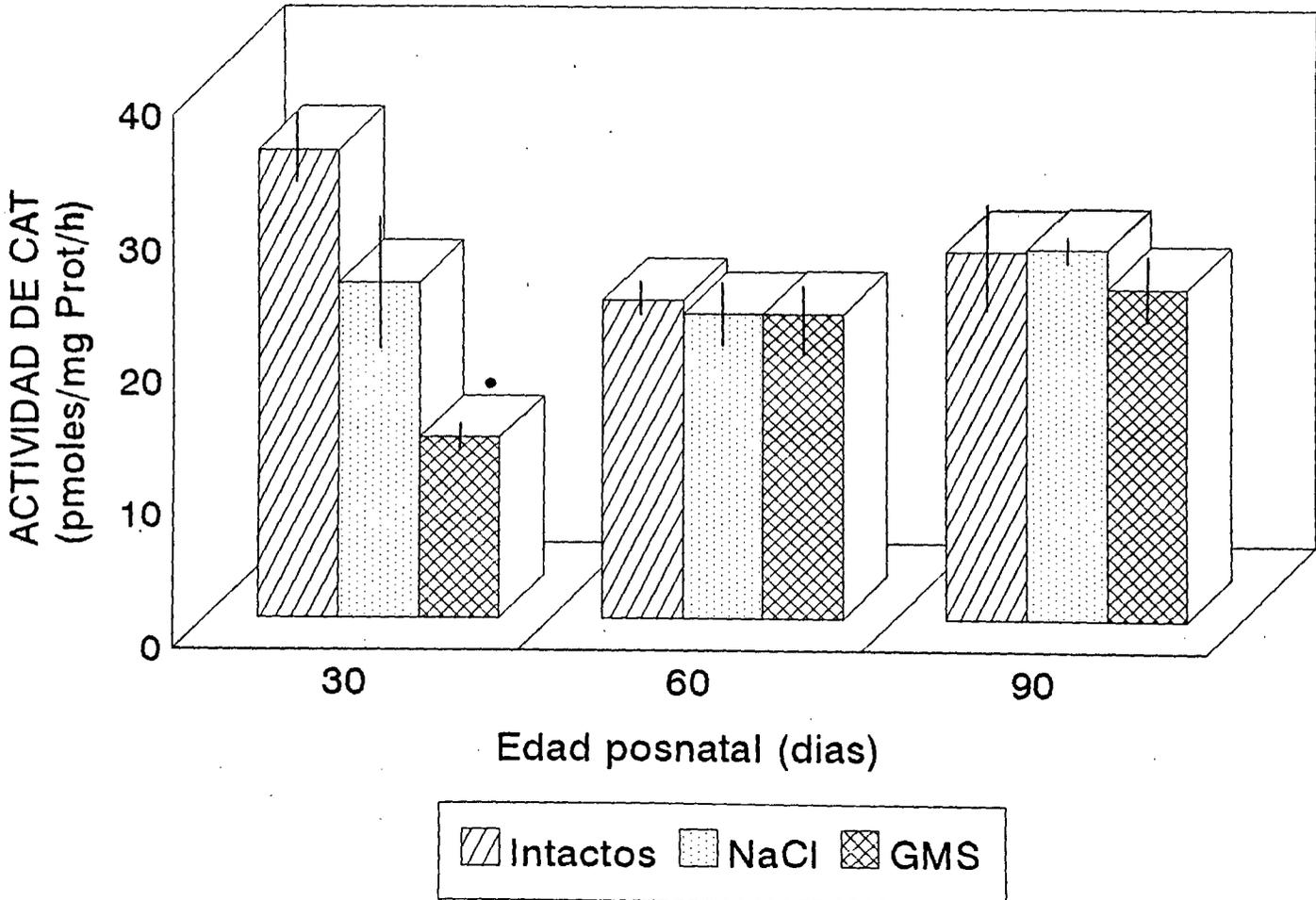
# CAT EN EL CUERPO ESTRIADO



## G R A F I C A 3

Actividad de CAT en hipocampo en ratas intactas y tratadas con NaCl y GMS a diferentes edades. Los resultados expresan la media  $\pm$  desviación estándar  $\bullet p < 0.001$  de 4-6 experimentos por duplicado.

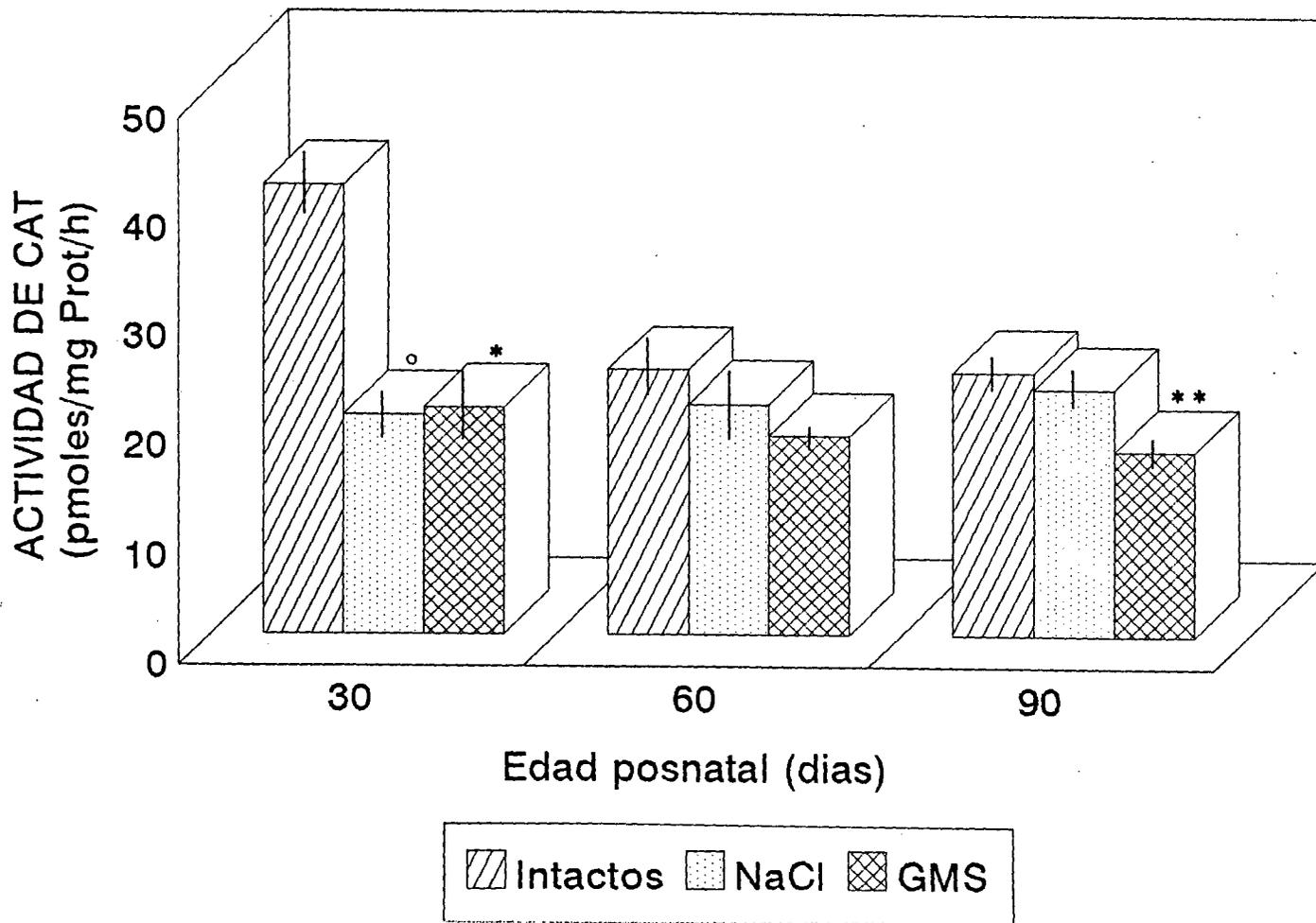
# CAT EN HIPOCAMP



**G R A F I C A 4**

Actividad de CAT en núcleos basales de Meynert en ratas intactas y tratadas con NaCl y GMS a diferentes edades. Los resultados expresan la media  $\pm$  desviación estándar  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  de 4-6 experimentos por duplicado.

# CAT EN NUCLEOS DE MEYNERT.





**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
Facultad de Ciencias Biológicas

Expediente.....  
Número .....  
Sección.....940/94.....

**C. IRMA GRICELDA ADAME GONZALEZ**  
**P R E S E N T E . -**

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "ACTIVIDAD DE LA COLINA ACETILTRANSFERA (E.C. 2.3.1.6.) EN DIFERENTES REGIONES DEL CEREBRO DE RATAS ADULTAS TRATADAS NEONATALMENTE CON GLUTAMATO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Carlos Beas Zarate.

**A T E N T A M E N T E**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**  
Las Agujas, Zapopan, Jal. 25 de Agosto de 1994  
**EL DIRECTOR**  
**DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES**



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE**

**EL SECRETARIO**

**BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO**

c.c.p.- M.C. Carlos Beas Zarate, Director de tesis.-pte.  
c.c.p.- El expediente del alumno.

**FAB>GBC>Cglr.**

Al contestar este oficio cítese fecha y número

C. Dr. Alfonso Islas Rodríguez  
Jefe de la División de Ciencias  
Biológicas y Ambientales de la  
Universidad de Guadalajara.

P R E S E N T E :

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la Pasante IRMA GRICELDA ADAME GONZALEZ código número 087732754 con el título ACTIVIDAD DE LA COLINA ACETILTRANSFERASA (E.C.2.3.1.6) EN DIFERENTES REGIONES DEL CEREBRO DE RATAS ADULTAS TRATADAS NEONATALMENTE CON GLUTAMATO MONOSODICO, consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

Guadalajara, Jal. a 7 de Junio de 1995

A T E N T A M E N T E

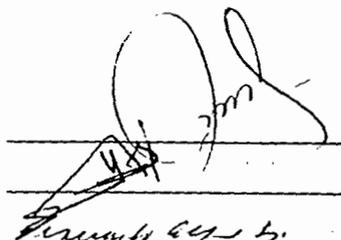
  
M. en C. Carlos Beas Zarate

SINODALES:

QFB. Rosa Maria Dominguez Arias

Dr. Alfonso Islas Rodríguez

Dr. Fernando Alfaro Bustamante

  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fernando Alfaro Bustamante*