
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE
SEROTONINA CEREBRAL SOBRE LA ACTIVIDAD
DEL SISTEMA COLINÉRGICO DURANTE EL
DESARROLLO DE LA RATA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA NEUROBIOLOGÍA
P R E S E N T A
IRMA GRICELDA ADAME GONZÁLEZ
GUADALAJARA, JALISCO. 2000

DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS
COORDINADOR DEL POSGRADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, C.U.C.B.A., U. de G.
P R E S E N T E

Por medio de la presente nos permitimos informarle a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por la BIOL. IRMA GRICELDA ADAME GONZÁLEZ código 087732754 titulado "EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE SEROTONINA CEREBRAL SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA COLINÉRGICO, DURANTE EL DESARROLLO DE LA RATA", consideramos que ha quedado debidamente concluido por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de grado.

Agradeciendo de antemano las atenciones prestadas a la presente quedamos de Usted, aprovechando la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Nextipac, Zapopán, Jal, 1999

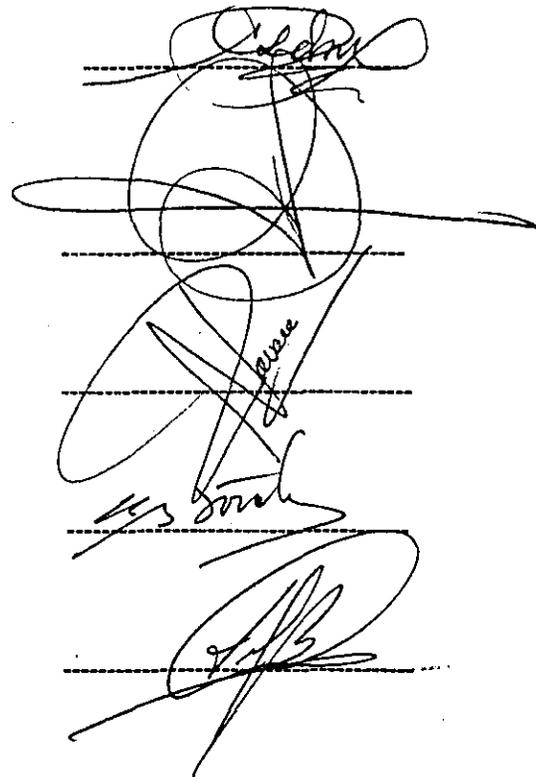
M. en C. ALMA ROSA DEL ANGEL MEZA
DIRECTOR DE TESIS Y
TERCER VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR

Dr. en C. DANIEL ORTUÑO SAHAGÚN
PRESIDENTE DEL COMITÉ EVALUADOR

M en C. ALICIA NAVARRO RUIZ
SECRETARIO DEL COMITÉ EVALUADOR

Dr. en C. CARLOS BEAS ZÁRATE
PRIMER VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR

Dr. en C. IGNACIO GONZÁLEZ BURGOS
SEGUNDO VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR



ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE NUTRICIÓN DE LA DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. EN C. ALMA ROSA DEL ANGEL MEZA.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que siempre ha estado conmigo en cada momento de mi vida, apoyándome, dándome mucho de su tiempo para seguir adelante sin esperar nada a cambio, por todo esto y mas, mil gracias

A la M. en C. Alma Rosa del Angel Meza, por la dirección del presente trabajo y sobre todo por su amistad, cariño y confianza que siempre me brindo.

A Mayra, Lety Ramírez y Lety Ontiveros por el apoyo que me han brindado en cada momento, y sobre todo por demostrarme que nuestra amistad existe por siempre. Gracias amigas.

A mis compañeras de trabajo y diversión que de alguna manera estuvieron siempre conmigo, en particular a Patricia Aranda, Monica Ureña, Verónica Chaparro, y María de la Luz Miranda.

A mis asesores por sus valiosas aportaciones para la realización del presente trabajo. Dr. Carlos Beas Zárate, Dr. Ignacio González Burgos, Dr. Daniel Ortuño Sahagún, y M. en C. Alicia Navarro.

INDICE

CONTENIDO	PAGINAS
GLOSARIO DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	25
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS.....	42

GLOSARIO DE FIGURAS

Figura 1. Transmisión Colinérgica	06
Figura 2. Estructura de los receptores nicotínicos a acetilcolina.....	07
Figura 3. Respuestas bioquímicas mediadas por los receptores muscarínicos...	08
Figura 4. Principales vías colinérgicas en el cerebro de rata.....	09
Figura 5. Metabolismo de serotonina	11
Figura 6. Distribución de las vías serotoninérgicas en el cerebro de rata.....	12
Figura 7. Peso corporal de ratas.....	29
Figura 8. Peso cerebral de ratas.....	30
Figura 9. Actividad de la colina acetiltransferasa en corteza frotal.....	31
Figura 10. Actividad de la colina acetiltransferasa en hipocampo.....	32
Figura 11. Unión de [³ H]-QNB a receptores muscarínicos en corteza frontal.....	33
Figura 12. Unión de [³ H]-QNB a receptores muscarínicos en hipocampo.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

a	Aminoácido
aa	Aminoácidos
AC	Acetilcolina
ACE	Acetilcolinesterasa
[³ H] Acetil CoA	Acetil coenzima A marcado con tritio
Ca ⁺⁺	Ión calcio
CAT	Colina acetiltransferasa
Cf	Corteza frontal
Cl ⁻	Ión cloro
DO	Dopamina
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EEG	Electroencefalograma
GABA	Acido gama-aminobutírico
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
H	Hipoproteico
Hp	Hipocampo
K ⁺	Ión potasio
Kd	Kilodaltones
Km	Constante de Michaelis
M	Molar
M	Maíz
M-L	Maíz-lisina
mM	Milimolar
μM	Micromolar
mg	Miligramos
μg	Microgramos
ml	Mililitros

μl	Microlitros
mCi	Milicuries
Na ⁺	Ión sodio
pMoles	Picomoles
pH	Potencial de hidrógeno
[³ H]QNB	Quinuclidil benzilato tritiado
SNC	Sistema Nervioso Central
Trp	Triptofano
5-HT	Serotonina
[³ H]-4-DAMP	4- difenilacetoxi-N- metilpiperidina metiodide

RESUMEN

La privación de aminoácidos indispensables en la alimentación influye de manera importante en la concentración de diversos neurotransmisores. Es el caso de la serotonina (5-HT), cuyos niveles dependen directamente de la concentración su precursor el triptofano (Trp), de ahí que los procesos cognoscitivos se vean afectados por una alimentación deficiente en aminoácidos (aa) que involucra a sistemas de neurotransmisión como el colinérgico y serotoninérgico. Por lo que la restricción de proteínas y Trp en la dieta que induce disminución de 5-HT podría estar relacionada con la actividad del sistema colinérgico.

En el presente trabajo se determinó si la alimentación a base de maíz, restringida en proteínas y Trp, modula la neurotransmisión colinérgica en corteza frontal e hipocampo, a los 14, 21, 30, y 60 días de edad de las camadas de ratas sujetas a 4 tipos de alimentación: testigo (T) e hipoproteica (H) con 23% y 8% de proteínas a base de alimento para roedores respectivamente, (**M**) a base de maíz y (M-L) maíz suplementado con lisina (Lis). Se determinó la actividad de la colina acetiltransferasa (E.C. 2.3.1.6), y la unión de [³H]-QNB a receptores muscarínicos.

Los resultados muestran una significativa disminución tanto del peso corporal como cerebral en todos los grupos experimentales. Así mismo se mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) de la actividad de CAT ante la disminución de proteínas en la dieta, tanto en corteza como en hipocampo y una disminución de ésta en los grupos **M** y M-L respecto al H, mientras que la unión de [³H]-QNB a receptores muscarínicos se encontró significativamente reducida en Cf ($p < 0.05$) en los grupos experimentales en todas las edades estudiadas excepto a los 60 días en el grupo **M** y principalmente a los 30 días en Hp ($p < 0.05$). La deficiencia de 5-HT así como de proteínas afecta la maduración del sistema colinérgico a través del aumento en la síntesis del neurotransmisor AC y reducción en el número de receptores muscarínicos. Esto puede alterar los procesos de memoria de largo término, así como algunos aspectos en el comportamiento.

ABSTRACT

Protein and essential aminoacid deficiency could induced a serious damage in the neurotransmission of the central nervous system, since the neurotransmitters levels depend of their precursor as in case of serotonin (5-HT) directly related with tryptophan (TRY) intake. On the other hand cognitive process are affected by the serotonergic and cholinergic system which seems to be related between them and to be sensitive to malnutrition.

This study was performed to evaluate the cholinergic system throughout the choline acetyltransferase (ChAc) activity and the muscarinic receptors binding during in development hippocampus and cerebral frontal cortex using a model of protein restriction and corn, based food whose protein in TRY deficient and produces a decrease in 5-HT brain levels.

The results obtained, showed a significant decrease in bath body and brain weight in all experimental groups studied, while ChAc activity was significant increased all experimental groups compared control animals, beside the corn -fed groups showed less ChAc activity in the protein restricted groups .

The muscarinic receptor binding was found significantly decrease in experimental groups compared control and at all ages studied except at 60 day old with corn-fed animals. Protein deficiency as well as reduction of (5-HT) concentration produced by less TRY intake in early life induced an increase in a acetylcholine significantly and a reduction in muscarinic receptor, affecting the cholinergic system maturation. It could modify long-term memory and some behavioral aspect.

INTRODUCCION

La nutrición adecuada es fundamental para el desarrollo óptimo de los organismos. En América Latina se ha estimado que el 60 % de la población de niños entre el nacimiento y los cinco años de edad tienen graves problemas de desnutrición. En el medio rural se ha encontrado que uno de cada tres niños nacen con bajo peso, debido a que la madre llevó una dieta insuficiente durante el embarazo, diversos estudios han relacionado a la desnutrición como un agente causal de diversos padecimientos, principalmente en los infantes, en quienes se ha encontrado una gran incidencia de infecciones gastrointestinales, así como baja resistencia a una gran diversidad de enfermedades (anemias, gripes, cólera, etc.), disminución de peso y estatura, así como deterioro en sus capacidades de aprendizaje y memoria (1, 2) lo que no les permite enfrentarse en forma adecuada a su entorno, debido a que crecen en un ambiente de ignorancia, insalubridad y pobreza, y consumen dietas con bajo contenido de nutrientes, como sopas de pasta, frijol y maíz. Estos productos son deficientes en contenido proteico y principalmente en aminoácidos esenciales, como lisina y triptofano (Trp), este último es el precursor de la síntesis de serotonina (5-HT) cerebral, un neurotransmisor y neuromodulador involucrado en la regulación de la liberación de hormonas, y de factores de crecimiento así como en la organización de algunos procesos cognoscitivos (3).

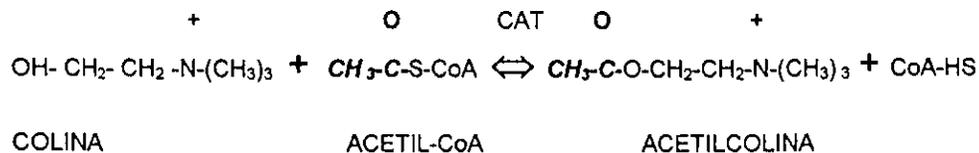
Se ha reportado que cuando se consumen dietas deficientes en Trp se ocasiona una disminución de 5-HT, lo que da como resultado disturbios en las funciones cerebrales mediadas por este neurotransmisor. Del mismo modo, se ha observado que la 5-HT muestra una interdependencia funcional con diversos sistemas de neurotransmisores tales como el gabaérgico y el colinérgico, en áreas como la corteza cerebral y el hipocampo, que reciben fibras serotoninérgicas de los núcleos del rafe dorsal y medial y que se traslapan con la inervación colinérgica proveniente del área septal, e incluso se ha observado que existen receptores a 5-HT sobre las terminales colinérgicas (4,5,6). Se ha sugerido que una lesión

farmacológica del sistema serotoninérgico produce un efecto inhibitor sobre las neuronas colinérgicas, e induce una disminución en la síntesis de 5-HT y un aumento de la liberación de Acetilcolina lo que repercute en el comportamiento de los organismos inducido por una inadecuada regulación entre ambos sistemas, este fenómeno afecta la expresión del ritmo teta (θ) hipocampal necesario para la consolidación de la memoria de largo plazo y la orientación espacial en la rata (7,8, 9). De manera similar, se han realizado estudios relacionados con desnutrición pre- y posnatal y se han descrito severas alteraciones en neuronas, desde una reducción en el número, tanto de sus ramificaciones dendríticas como de sus espinas así como del número de sinapsis en las diversas regiones cerebrales, e incluso modificaciones en el ritmo de división celular (10). En este estudio se investigó si la restricción proteica, y de Trp, modulan la transmisión colinérgica a través de la 5-HT en áreas cerebrales donde estos dos sistemas establecen una interacción .

ANTECEDENTES

SISTEMA COLINÉRGICO

En el cerebro de los mamíferos, la información entre las neuronas se transmite a través de una sustancia química denominada neurotransmisor, que se libera en las sinapsis como respuesta a un estímulo específico. El neurotransmisor secretado actúa en sitios receptores especializados y altamente selectivos que se localizan en la célula postsináptica, lo que provoca cambios en el metabolismo de ésta, mismos que modifican su actividad celular. Uno de los neurotransmisores involucrados en este proceso es la acetilcolina (AC). Se calcula que del 5 al 10 % de las sinápsis en el Sistema Nervioso Central (SNC) son de tipo colinérgico (11). La AC se sintetiza a partir de la colina, que se acumula en la neuronas colinérgicas mediante una reacción de la acetil CoA y bajo la influencia enzimática de la colina acetiltransferasa (CAT) (E.C.2.3.1.6).



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 interpeduncular, el núcleo caudado, la retina, el epitelio coronal, el hipocampo, la corteza cerebral y las raíces centrales de la medula espinal (12). Se sintetiza en el soma neuronal y viaja a lo largo del axón, posiblemente unida a los neurotúbulos que actúan como transportadores, sin embargo también se ha señalado la síntesis de esta proteína en los axones preterminales y botones terminales (13, 14). La CAT tiene un peso molecular aproximado de 66 a 70 kd, con una constante de Michaelis (km) de 7.5×10^{-4} M para la colina y de 1.0×10^{-5} M para la Acetil CoA (15).

Existen al menos dos depósitos de AC en las neuronas colinérgicas; uno de ellos actúa como reserva, y el otro lo constituye la AC lista para ser liberada. La

liberación de AC depende del aumento de la concentración de Ca^{++} intracelular que fluye al interior de la neurona en virtud de la depolarización de la membrana presináptica y la consecuente activación de 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 de tal manera que el contenido de dichas vesículas se vacía hacia el espacio sináptico, y una vez liberada la sustancia transmisora ésta, difunde a través del espacio intersináptico y se une selectivamente con moléculas receptoras que están presentes en la membrana postsináptica. Lo anterior permite la inducción de cambios bioquímicos y eléctricos en la célula postsináptica que dependen del tipo de receptor y de la forma en que éste se encuentre sincronizado con los sistemas de transducción (fig 1). Los receptores de membrana cuya función principal es la transducción de señales, pueden dividirse en dos tipos : a) los receptores que permiten la apertura de canales iónicos, como los nicotínicos para AC, los $GABA_A$ y los de Glicina, que poseen un sitio de unión para el neurotransmisor y contienen el canal iónico responsable de transmitir la señal hacia el interior de la célula y ; b) un segundo tipo de receptor que interactúa con proteínas unidas a nucleótidos de guanina (proteína G), como los colinérgicos de tipo muscarínico (16). Estructuralmente, estos receptores están formados por cadenas polipeptídicas : dos de tipo alfa, responsables de reconocer la AC y tres cadenas denominadas, beta, gama, y delta, respectivamente cuya depresión central provoca la entrada y salida de iones (fig 2 y 3)(17).

Los receptores muscarínicos se pueden clasificar, según su afinidad por pirenzepina, en dos tipos denominados como M1, que son de alta afinidad y predominantes en el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza cerebral ; y los de tipo M2 de baja afinidad localizados en el cerebelo y la corteza cerebral (18, 19, 20, 21). Por su parte los M3 han sido identificados mediante la utilización de $[^3H]$ -4-DAMP (22, 23). La autoradiografía de los M4 y M5 aún no ha sido desarrollada ; sin embargo, se han realizado estudios de biología molecular mediante los cuales se

han identificado al menos cinco genes diferentes denominados m1, m2, m3, m4 y m5 que codifican para receptores muscarínicos. Los subtipos m1 y m2 parecen coincidir con los M1 y M2, caracterizados por su afinidad a pirenzepina. Los m3 y m5 presentan afinidad a [³H]-4-DAMP, en tanto que el m4 es de alta afinidad a pirenzepina (24, 25).

Muchas de las evidencias sobre la localización de las vías colinérgicas en el cerebro han sido obtenidas por estudios histoquímicos de la acetil colinesterasa (ACE). Sin embargo, esta enzima no solo se localiza en neuronas colinérgicas, por lo que se han utilizado anticuerpos específicos para la CAT así mismo, se han aplicado técnicas inmunohistoquímicas para la localización de estructuras colinérgicas, así ha sido posible desarrollar un mapeo sobre la distribución de las neuronas y fibras colinérgicas con un alto grado de precisión (26). De esta manera, para dar a conocer la localización de los núcleos neuronales y la organización de las proyecciones colinérgicas en el encéfalo se introdujo una clasificación que se designa como “ch” y con números progresivos (ch1-ch6). Con base en ello las neuronas colinérgicas localizadas en el cerebro frontal basal (ch1-ch4) proporcionan la mayor fuente de inervación a la corteza cerebral, al hipocampo, a la amígdala y al bulbo olfatorio ; mientras que las neuronas colinérgicas en el tallo cerebral (ch5-ch6) proporcionan la mayor fuente de inervación hacia el tálamo, el hipotálamo y el cerebro anterior basal. Una importante aferencia llega al núcleo talámico reticular proveniente del cerebro frontal basal y del tallo cerebral. Las proyecciones de las células colinérgicas que parten del tallo cerebral hacia el cerebro frontal basal constituyen otras vías a través de las cuales estos pueden actuar concertadamente (27) (fig 4).

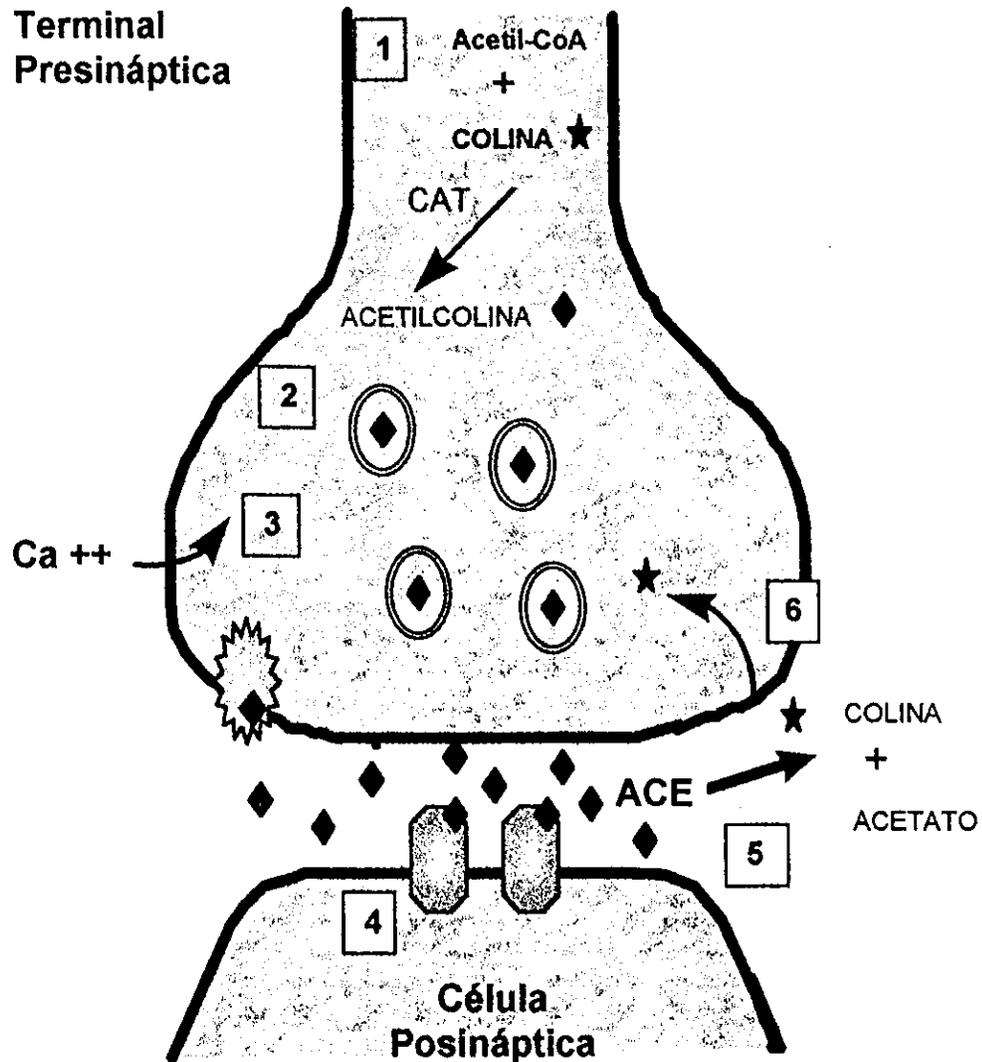


FIGURA. 1 TRANSMISIÓN COLINERGICA.

1) Síntesis de AC bajo la acción de CAT; 2) Vesiculación de AC; 3) La liberación de AC requiere de Ca^{++} extracelular, el cual entra a la neurona cuando ésta es despolarizada; 4) Una vez en el espacio sináptico, la AC interactúa con el receptor posináptico, que puede ser de dos tipos: nicotínicos o muscarínicos; 5) El mecanismo de eliminación de la AC del espacio intersináptico está relacionado con la actividad hidrolítica de la ACE; 6) Una vez hidrolizada la AC, aproximadamente 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.

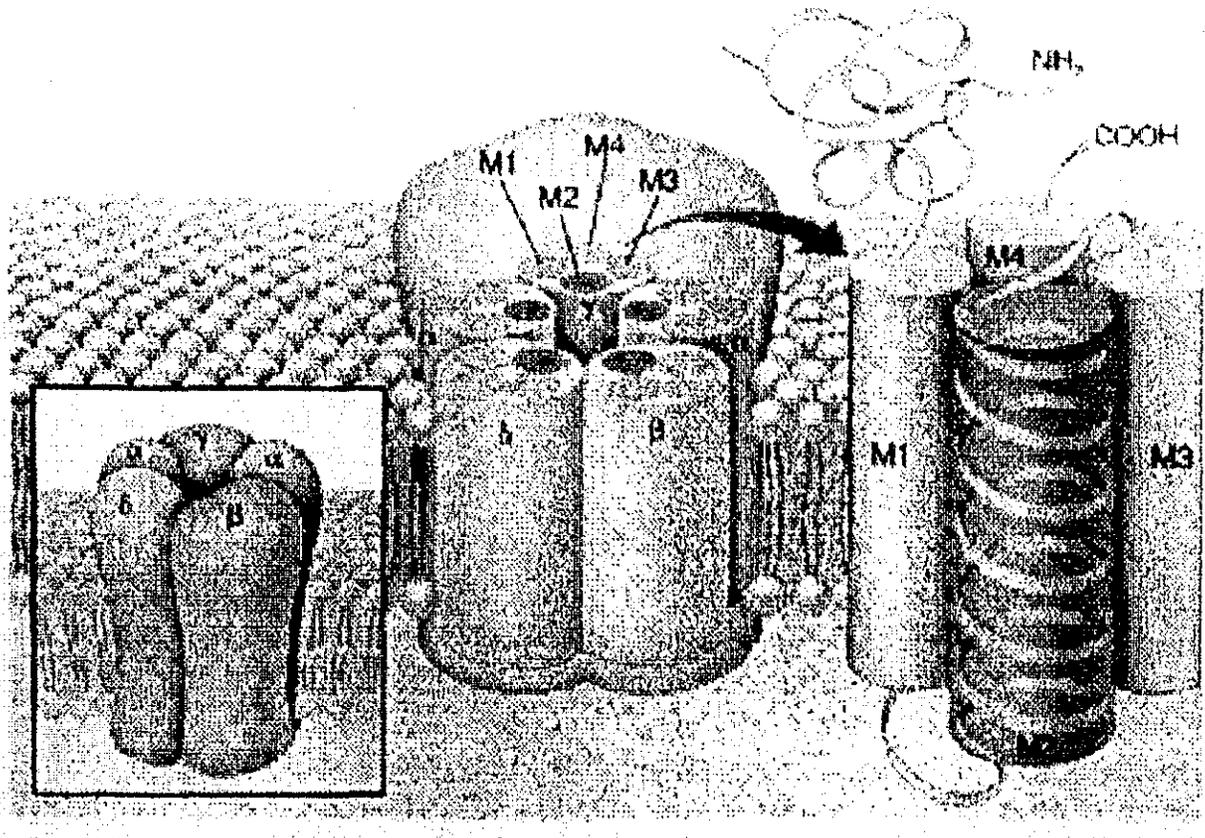


Figura 2. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS A ACETILCOLINA

Los receptores a acetilcolina están constituidos por cinco subunidades, cada una incluye una región hidrofílica con su amino terminal (NH_2) y cuatro segmentos membranales hidrofóbicos: M1, M2, M3 Y M4 formados por cadenas polipeptídicas: dos de tipo alfa (α), responsables de reconocer la AC y tres cadenas denominadas, beta (β), gama (γ) y delta (δ), cuya depresión central provoca la entrada y salida de iones.

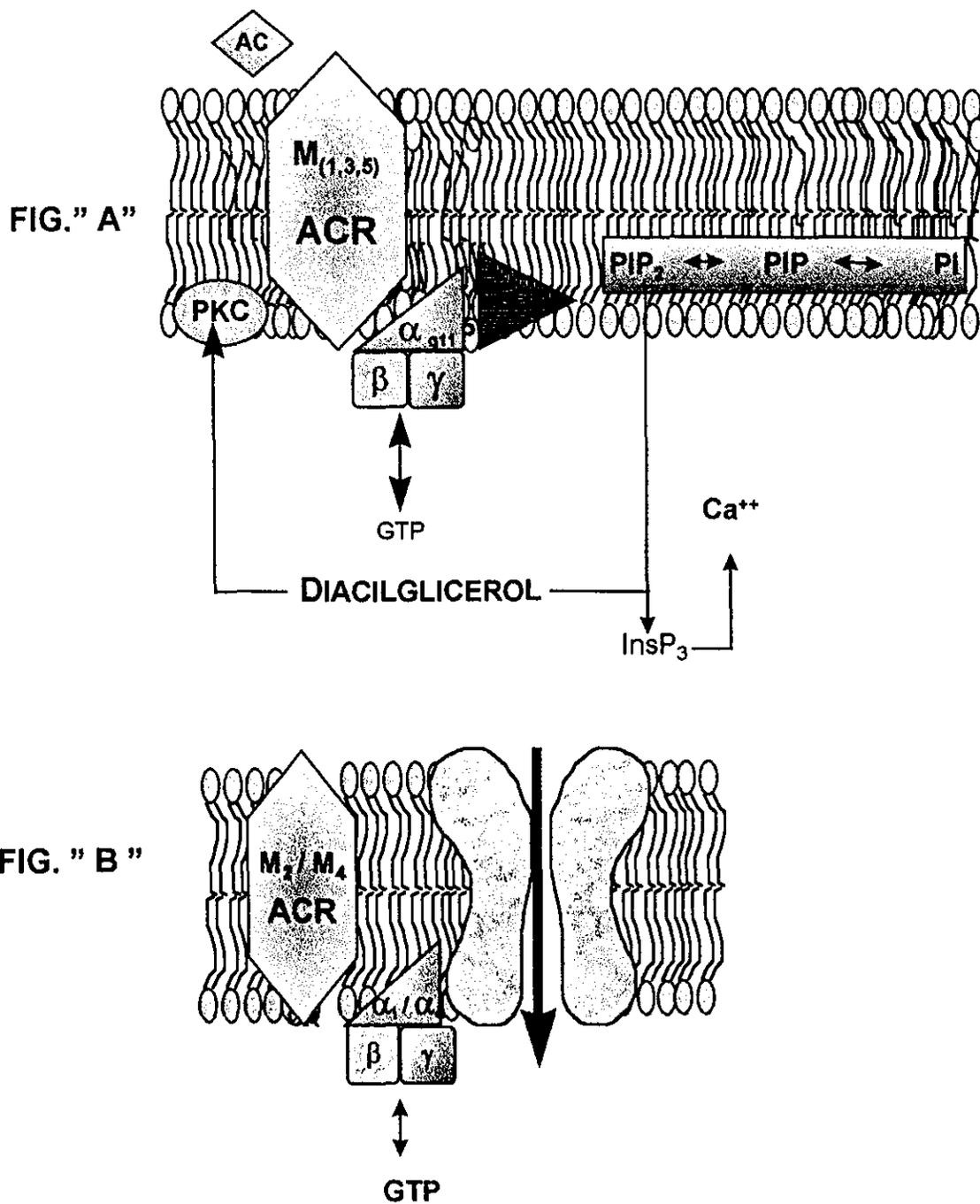


Figura 3. RESPUESTAS BIOQUÍMICAS MEDIADAS POR LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS.

Fig A. Estimulación de fosfolipasa C.

La acetilcolina interactúa con un subtipo de receptor para inducir una respuesta celular. Así los M1, M2, y M5 interactúan con la subunidad α de la proteína G_{q11} unida a GTP para activar la fosfolipasa C (FLC_B) y los canales de K^+ respectivamente.

Fig B. Regulación de canales de K^+ y Ca^{++}

Los receptores M2 y M4 regulan ciertos canales de iones a través de las proteínas G_i y G_o .
Mediadores intracelulares : ($InsP_3$) inositol trifosfato ; (PIP_2) fosfatidil inositol bifosfato ; (PIP) fosfatidil inositol monofosfato ; (PI) fosfatidil inositol

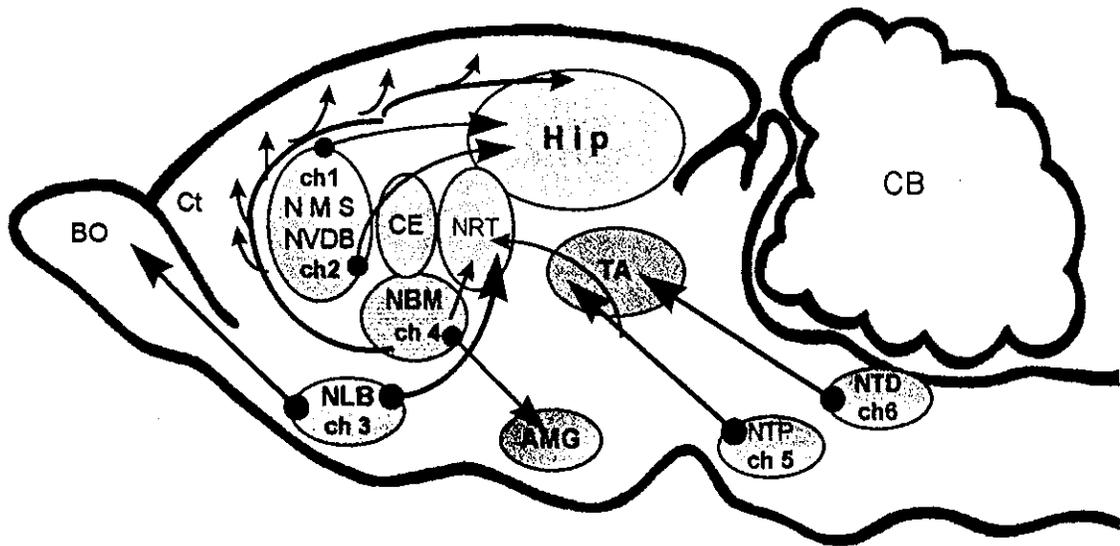


Figura 4. PRINCIPALES VÍAS COLINÉRGICAS EN EL CEREBRO DE LA RATA.

Las designaciones Ch1-Ch6 identifican grupos de neuronas colinérgicas contenidas dentro de varios núcleos del cerebro anterior y tronco cerebral. Abreviaciones : (AMG) amígdala ; (CB) cerebelo ; (CE) cuerpo estriado ; (CT) corteza ; (NLB) núcleo límbico horizontal de la banda diagonal de Broca ; (Hip) hipocampo ; (NTD) núcleo tegmental dorsolateral ; (NMS) núcleo medio septal ; (NBM) núcleo basal de Meynert ; (BO) bulbo olfatorio ; (NTP) núcleo tegmental pendunculopontino ; (TA) talamo ; (NRT) núcleo reticular talámico ; (NVDB) núcleo límbico vertical de la banda diagonal de Broca .

SISTEMA SEROTONINERGICO (5-HTérgico).

La (5-HT) actúa como neurotransmisor o neuromodulador y participa en la regulación de: los ciclos sueño-vigilia, la sensibilidad al dolor, la locomoción, la transmisión de información, y constituye un importante regulador hormonal. Este neurotransmisor es sintetizado a partir del Trp ; un aminoácido (a) indispensable que se obtiene a partir de la ingesta de nutrientes que lo contienen y es fundamental para el crecimiento así como el adecuado funcionamiento de algunas vías metabólicas. La reacción de síntesis de 5-HT comienza con la hidroxilación del Trp por la enzima Trp-hidroxilasa, para formar 5-hidroxitriptofano (5-HT_{trp}), seguida por la descarboxilación de éste último a 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina, que posteriormente es degradada a su metabolito final, que es el ácido-5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) por medio de la enzima monoamina oxidasa (fig 5).

El Trp se encuentra en el torrente sanguíneo. Del 10 al 20 % se encuentra libre en sangre y el resto se une a la albúmina, transportador de aminoácidos (aa) neutros. Sin embargo se ha sugerido que la concentración de 5-HT se puede alterar por diversos factores tales como baja concentración de albúmina, y altos niveles de aminoácidos (aa) neutros (leucina, tirosina, valina, metionina) en el plasma, obtenidos por la ingesta de proteínas, que compiten con el Trp por el paso a través de la barrera hematoencefálica al cerebro. Por otra parte, una elevada ingesta de carbohidratos induce la liberación de insulina la cual estimula la captura de aa neutros para la síntesis de proteínas musculares ; consecuentemente el transporte de Trp al cerebro se incrementa y hay una mayor cantidad disponible para la síntesis de 5-HT, (28, 29).

Las neuronas 5-HTérgicas están confinadas principalmente en los núcleos del complejo del Rafé localizados en el tallo cerebral, de los cuales emergen proyecciones ascendentes hacia diversas estructuras tales como el cerebelo, el talamo, la formación hipocampal, la sustancia negra, el hipotálamo, la neocorteza y los bulbos olfatorios ; mientras que las proyecciones descendentes se dirigen principalmente hacia la médula espinal (30, 31) (fig 6)

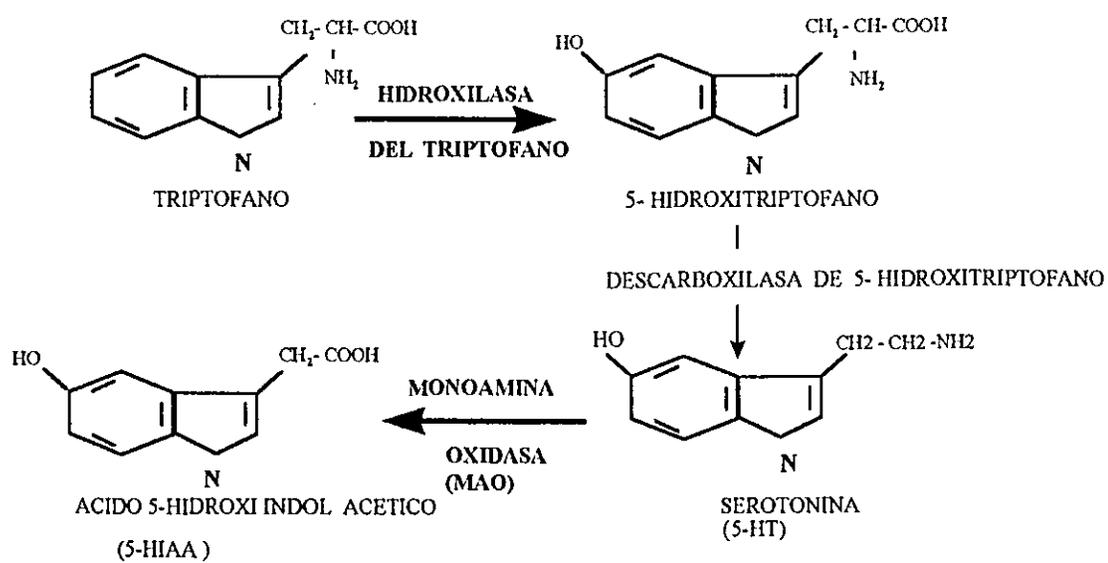


Figura. 5. Describe las vías metabólicas que inducen a la síntesis de la 5-HT a partir del triptófano, y la degradación a su metabolito final, el ácido 5-HIAA, así como las enzimas que intervienen en cada caso.

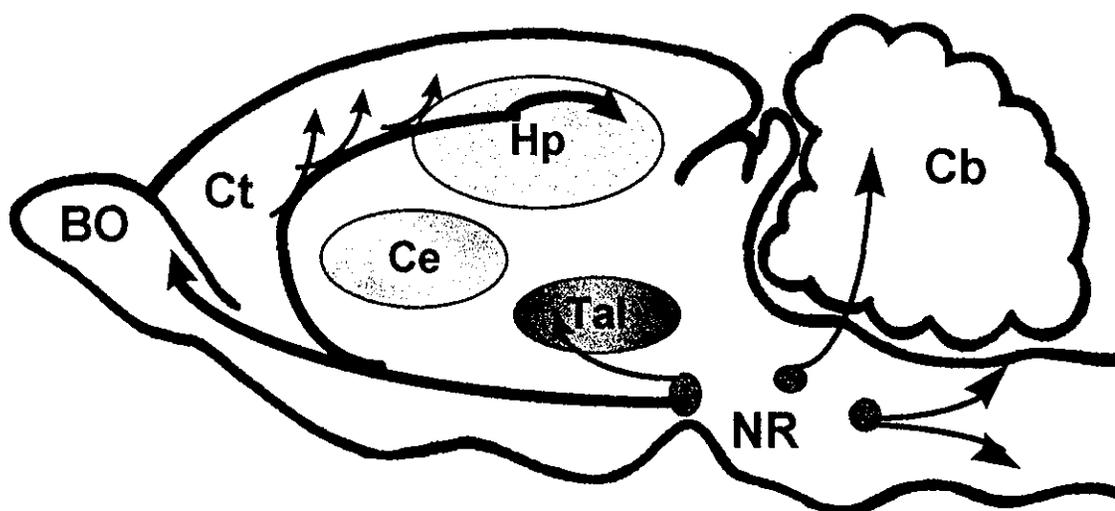


Figura 6. DISTRIBUCIÓN DE LAS VÍAS SEROTONINÉRGICAS EN EL SNC.

Representa la localización de los principales cuerpos celulares que contienen serotonina. (Hp) hipocampo ; (Ce) cuerpo estriado ; (Tal) tálamo ; (NR) núcleos del Rafé ; (Ct) corteza ; (BO) bulbo olfatorio ; (Cb) cerebelo.

INTERACCIÓN ENTRE LOS SISTEMAS COLINÉRGICO Y SEROTONINÉRGICO

El sistema colinérgico y el serotoninérgico han sido el foco de atención de numerosos estudios neuroquímicos y neuropatológicos, mediante los que se ha demostrado que algunas regiones inervadas por estos sistemas, como son el hipocampo y la corteza cerebral, están involucradas de manera importante en algunos procesos cognoscitivos (2).

Así, la corteza cerebral frontal esta involucrada en muchas funciones importantes tales como en la articulación de lenguaje, en los movimientos voluntarios de la musculatura esquelética, en el pensamiento lógico, y en la organización del aprendizaje y la memoria. Tal información es organizada y procesada por áreas específicas. Así, en la corteza motora tiene células de proyección llamadas células de Betz encargadas de controlar los movimientos voluntarios. Delante de esta zona se encuentra el área premotora cuya función es controlar los movimientos automatizados del cuerpo, a la cual llegan aferencias de la región piramidal y extrapiramidal. Rostralmente a esta última se encuentra la región prefrontal, implicada en la integración de información y en la organización de memoria de corto plazo, y esencial en las funciones cognoscitivas involucradas en la integración de conceptos y acciones. A esta región llega información procedente de distintos sistemas sensoriales debido a que establece conexiones recíprocas con diferentes áreas tales como con los núcleos dorsomedial del tálamo, de las áreas límbicas, y de las de asociación provenientes de los lóbulos parietal, occipital y temporal (32, 33).

El hipocampo, es una estructura que forma parte del sistema límbico, funcionalmente esta involucrado en la organización del aprendizaje y memoria, participa de manera importante en la integración de la información que llega al cerebro, y actúa como regulador de las respuestas motoras, Anatómicamente esta constituido por cuatro regiones: la primer región esta formada por el subículo, presubículo y parasubículo que se denomina complejo subicular; la segunda región

está constituida por la corteza entorrinal; la tercera es el Cuerno de Ammón el cual está formado por una hilera de células piramidales, a esta región se le ha subdividido en cuatro campos los CA1, CA2, CA3 Y CA4 ; la cuarta región es el giro dentado, que contienen células granulares. El hipocampo esta interconectado con muchas regiones, en él, concurren fibras aferentes que derivan de varias fuentes, entre las que destaca la corteza temporal adyacente ; Una segunda fuente emerge de la región septal, cuyas fibras septohipocampales penetran al hipocampo a través del haz del fornix . Por otra parte las vías eferentes se originan en los axones de las células piramidales del Cuerno de Ammón que se proyectan a varias estructuras cerebrales(34,35, 36).

Tanto el hipocampo como la corteza frontal están inervados por diversos sistemas de neurotransmisión, entre los que se encuentran el serotoninérgico y el colinérgico. A este último se le ha relacionado ampliamente en procesos de aprendizaje y memoria (37, 38). Existen evidencias en humanos, y en diversas especies animales, de la participación del sistema colinérgico en estos procesos cognoscitivos. Se ha demostrado por estudios clínicos que en aquellos pacientes que padecieron el síndrome de Alzheimer mostraron una marcada reducción de aferencias colinérgicas provenientes de los núcleos basales de Meynert (NBM) hacia la corteza cerebral, así como una reducción de la actividad de la CAT tanto en el hipocampo como en el cuerpo estriado (39, 40, 41). De igual manera, se ha demostrado que cuando se lesiona el sistema colinérgico o se administran antagonistas a receptores a AC, se inducen tanto deficiencias en la realización de pruebas que requieren de aprendizaje y de la memoria como una reducción de la actividad de la CAT en diferente regiones cerebrales (42, 43).

Por otro lado, no solo el sistema colinérgico esta implicado en estos desórdenes cognoscitivos, existen evidencias de la participación del sistema serotoninérgico en diversas funciones integrativas relacionadas con la expresión conductual, sin embargo, aún son inconsistentes los datos que relacionan este sistema con procesos de aprendizaje y memoria. Se ha reportado que la disminución de 5-HT después de la administración de 5,7- dihidroxitriptamina (5-7-DHT) induce

algunas deficiencias en pruebas que requieren aprendizaje en laberinto, sin ningún efecto en los procesos de memoria espacial (44, 45) y con una mayor eficiencia en aquellas pruebas de latencia de escape (46). Así mismo con la aplicación de paraclorofenilalanina (PCPC) inhibidor de la síntesis de 5-HT se observan alteraciones semejantes en diversas pruebas que requieran del aprendizaje y de la memoria en ratas (47), ahora bien con un modelo de restricción de 5-HT inducida por una deficiencia de Trp en la dieta, se ha mostrado deterioro en la realización de pruebas de aprendizaje espacial (48) y correlativamente con ello se observó una disminución significativa en el número de espinas dendríticas del área CA1 del hipocampo (49). Sin embargo, animales sometidos al mismo esquema, en el desempeño de una tarea que requiere memoria de corto plazo fueron más eficientes (50) correlativamente con un incremento en la longitud dendrítica y en el número de espinas de neuronas piramidales de corteza prefrontal (51).

Por otra parte, estudios clínicos han sugerido que la disminución de la concentración de 5-HT, así como de sus receptores, esta relacionada con algunas neuropatologías tales como el síndrome de Alzheimer y la esquizofrenia (52), sin embargo, no se ha establecido la relación que tiene el sistema serotoninérgico en estos procesos cognoscitivos. Su efecto se puede explicar con la interacción neuroquímica con otros sistemas de neurotransmisores de los cuales se conoce su participación, tales como el sistema colinérgico.

Existen evidencias experimentales donde se han examinado los efectos de la manipulación farmacológica simultánea de ambos sistemas de neurotransmisión y se ha demostrado que cuando se lesiona únicamente el sistema serotoninérgico se provoca una reducción en los niveles de 5-HT y tiene poco o ningún efecto en pruebas conductuales, por otra parte al lesionar los núcleo basal de Meynert (NBM) y las vías septo-hipocampales se induce una marcada pérdida de la actividad de la CAT en corteza cerebral e hipocampo respectivamente, así como, una deficiencia en la memoria espacial, sin embargo, al lesionar ambos sistemas de manera simultánea, se observan deficiencias intensificadas (7, 53, 54). Por otra parte, las deficiencias causadas por la lesión de los sistemas colinérgico y serotoninérgico,

se recuperan cuando se implanta tejido intra -hipocampal fetal proveniente del complejo del Rafé o de la región Septal (55, 56). Nilsson y col (57) demostraron que cuando se implanta ambos tejidos simultáneamente hay una recuperación en aquellas pruebas que requieren memoria de corto y largo plazo. También existen evidencias que indican que la actividad electrocortical, el ritmo teta hipocampal, y el control de aprendizaje y la memoria, se modulan por la interacción entre los sistemas serotoninérgico y colinérgico ya que cuando se bloquean ambos sistemas simultáneamente se suprimen todas las actividades electroencefalográficas e inducen severos daños cognoscitivos en pruebas que requieren de aprendizaje y memoria (58, 43). Así mismo se ha demostrado que ante la lesión de las neuronas serotoninérgicas se disminuye la síntesis de 5-HT y se eleva la AC en corteza frontal y en el hipocampo (59), debido a que las neuronas colinérgicas reciben contactos sinápticos de terminales serotoninérgicos (60, 61), incluso se ha observado que existen receptores a 5-HT de tipo 5-HT₂ en las terminales colinérgicas (4) , así mismo se ha reportado que la activación de los receptores tipo 5-HT_{1A} inducen liberación de AC en el hipocampo de ratones y cobayos (62).

De igual manera se ha demostrado que la deficiencia de aminoácidos en la alimentación influye de manera importante en la concentración de diversos neurotransmisores, como son dopamina (DA), noradrenalina y 5-HT, cuyos niveles dependen directamente de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y Trp respectivamente (63), así, se puede ver que la disminución de estos elementos se refleja en algunos efectos psiconeuronales en los individuos, relacionados con las alteraciones en el desarrollo y la neuroquímica del cerebro principalmente si esta privación ocurre durante la etapa de gestación, y lactancia en las que el cerebro tiene su crecimiento y desarrollo más acelerado (64, 65, 66).

El hipocampo es una de las regiones mas vulnerables al efecto de la restricción de nutrientes. La neurogénesis de esta región ocurre en el mono *rhesus* prenatalmente y posnatalmente en algunas especies como la rata (67, 68). En esta última se ha encontrado que la desnutrición temprana induce reducción en el número de células en las áreas, CA1, CA3, y CA4 y en giro dentado ; así como

daños en la potenciación de largo plazo (69, 70). Cintra y col 1990 (71) observaron que la malnutrición proteica crónica, induce atrofia del soma neuronal en la arborización dendrítica y en la densidad de espinas en las células granulares del giro dentado, fenómeno similar a lo encontrado en las células piramidales de la región CA3 del propio hipocampo (72).

Así mismo, se han observado alteraciones en algunas enzimas involucradas en las funciones cerebrales, entre las que se encuentran la ACE, enzima que participa en la degradación del neurotransmisor AC. Se reportó que con una dieta deficiente en su contenido proteico durante la gestación, la lactancia y posdestete se induce una disminución de la ACE (73), sin embargo, Rocha y col. (74), demostraron que la restricción de alimento desde la gestación incrementó la actividad de la enzima ACE en cerebelo, cuerpo estriado y el hipotálamo, sin ningún cambio en el hipocampo, ni en la corteza motora.

A pesar de que la desnutrición induce una sustancial reducción en la inervación colinérgica hipocampal y en el número de neuronas colinérgicas (75). No ha sido posible establecer generalizaciones sobre la forma en que operan ambos sistemas en la organización de los procesos neuropsicológicos en los que están involucrados. Por lo que en este estudio se investigó la influencia que la 5-HT ejerce sobre la neurotransmisión colinérgica evaluado por la actividad de CAT y la unión de [³H]-QNB a receptores muscarínicos mediante la restricción proteica y de Trp a lo largo del desarrollo posnatal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema colinérgico se ha relacionado directamente con diversos aspectos cognoscitivos tales como aprendizaje y memoria. Para la adecuada manifestación de dichos procesos, es indispensable la interacción neuroquímica entre los diferentes sistemas de neurotransmisión. Además se ha demostrado que el sistema serotoninérgico, esta involucrado en diversas funciones relacionadas con la expresión conductual.

Existen evidencias de la manipulación farmacológica de los sistemas colinérgico y serotoninérgico. Se ha demostrado que cuando se daña sólo el sistema colinérgico se inducen deficiencias en pruebas que requieren de aprendizaje y memoria correlacionadas con una disminución de la actividad de colina acetiltransferasa, éstas se intensifican al dañar además el sistema serotoninérgico, y se recuperan al transplantar ambos tipos neuronales. Sin embargo, no se ha establecido cuales son las modificaciones neuroquímicas que ejerce un neurotransmisor sobre otro, ni la forma en que operan ambos sistemas en la organización de los procesos neuropsicológicos en los que están involucrados.

Por lo que es importante establecer si la restricción de triptofano y por consiguiente de serotonina cerebral influye en la actividad del sistema colinérgico

HIPOTESIS

LA DISMINUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA CEREBRAL INDUCIDA POR UNA DIETA DEFICIENTE EN TRIPTOFANO AUMENTA LA ACTIVIDAD CEREBRAL DEL SISTEMA COLINERGICO.

OBJETIVO GENERAL

CARACTERIZAR LAS ALTERACIONES EN LA ACTIVIDAD DE LA COLINA ACETILTRANSFERSA (E.C.2.3.1.6), Y LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS INDUCIDOS POR LA DEFICIENCIA DE TRIPTOFANO EN LA DIETA, EN DIFERENTES REGIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA DUANTE SU DESARROLLO POSNATAL .

OBJETIVOS PARTICULARES

CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD DE COLINA ACETILTRANSFERSA (E.C.2.3.1.6) EN LA CORTEZA FRONTAL Y EL HIPOCAMPO DE RATAS SOMETIDAS A ALIMENTACIÓN HIPOPROTEICA, A BASE DE MAÍZ Y MAÍZ-LISINA ; A LOS 14, 21, 30 Y 60 DÍAS DE EDAD.

DETERMINAR LA UNIÓN DEL LIGANDO QUINUCLINIDIL BENZILATO [³H]-QNB A RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA CORTEZA FRONTAL Y EL HIPOCAMPO DE RATAS SOMETIDAS A ALIMENTACIÓN HIPOPROTEICA, A BASE DE MAÍZ Y MAÍZ-LISINA ; A LOS 14, 21, 30 Y 60 DÍAS DE EDAD.

MATERIAL Y METODOS

a).- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN :

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar, de un peso aproximado de 250 gr ; las cuales se mantuvieron con acceso libre al agua y alimento, ciclos de luz-oscuridad de 12 x12 horas , humedad relativa de 40 a 50 % y temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

b).- PREPARACIÓN DE LA DIETA :

Los animales se alimentaron con diferentes dietas : testigo (T), con un 23% de proteínas, una dieta con 8 % de proteínas a base de alimento para roedores (H), una dieta a base de maíz (*M*), y maíz suplementado con lisina (M-L) (tabla 1).Las dietas fueron administradas desde 5 semanas antes del apareamiento, durante la gestación y el desarrollo de las crías hasta el sacrificio de estas a los 14, 21, 30 y 60 días de edad posnatal.

COMPOSICION DE LAS DIETAS

COMPONENTE (gr / 100 dieta)	CONTROL	HIPOROTEICA	MAIZ	MAIZ- LISINA
HARINA DE MAÍZ			86.00	86.00
ALIM. PARA ROEDORES	98.00	34.04		
ACEITE	2.0	3.13	2.00	2.00
GLUCOSA		19.00		
SACAROSA		20.10		
DEXTRINA		12.67		
VITAMINAS		1.00	1.00	1.00
MINERALES		1.00	2.10	2.10
CELULOSA		9.08	8.90	8.50
LISINA				0.40
% DE PROTEÍNA	23.0	8.0	8.0	8.0
Kcal / 100gr	350.0	350.0	346.5	346.5

TABLA 1. Muestra los elementos que constituyen a las diferentes dietas : Testigo (con un 23% de proteínas), hipoproteica, maíz, y maíz-lisina (con un 8% proteínas). Los datos se expresan en gramos por cada 100 gr del componente

c).- *PREPARACIÓN DEL TEJIDO.*

Una vez que los animales cumplieron la edad preestablecida se pesaron, se sacrificaron por decapitación y sus cerebros se removieron en frío (4°C) para obtener las siguientes regiones: corteza frontal, e hipocampo. El tejido se pesó en una balanza analítica y se homogeneizó en 1ml de solución de sacarosa 0.25M; las muestras fueron congeladas a -20 °C por un mínimo de 48 horas y un máximo de 5 días antes de realizar los ensayos.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CAT.

La actividad de la CAT se determinó por el método de Fonnum 1975 (76), que brevemente consistió en lo siguiente: para iniciar el ensayo, el tejido descongelado se diluyó (1:6) en sacarosa 0.25 M y posteriormente en una solución de sacarosa-triton X-100 al 0.2%. Para el ensayo se tomaron 15 µl de cada muestra de tejido y en un tubo de ensayo (800µl de capacidad) se preincubó por 30 seg en un baño a 37 °C a la cual se agregaron 15 µl de la mezcla del sustrato que contenía [³H]-Acetil CoA (act. esp 1.920), 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 y amortiguador de fosfatos de sodio 200 mM, pH 7.4. Esta mezcla se incubó nuevamente durante 20 minutos. Los testigos se realizaron con 15 µl de sacarosa 0.25 M en lugar del tejido a los cuales se les adicionó 15 µl 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 se colocaron en otro vial al cual se agregó 5 ml de líquido de centelleo para cuantificar la radiactividad en un

contador de centelleo líquido Bekman LS 65000. La actividad de la CAT se expresó 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 y col 1951 (77). 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 0.2%).

CUANTIFICACION DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS POR UNIÓN A [³H]-QNB.

El tejido obtenido se descongeló y resuspendió en sacarosa 0.25 M, se centrifugó a 22,000 Xg durante 20 min, enseguida se homogeneizó el sedimento en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos, 50 mM, pH 7.4. Posteriormente, se centrifugó de nuevo por 20 min a 22,000 Xg para la obtención de la fracción membranal, nuevamente se desechó el sobrenadante. El sedimento se homogeneizó en 1ml de la solución amortiguadora, a partir de la cual se realizaron diferentes diluciones, para preparar dichas diluciones ; se tomó en cuenta la cantidad en gramos de tejido presente en el homogeneizado y se consideró la variación en el contenido de proteínas de acuerdo a la edad (2 a 6%), a fin de mantener una concentración aproximada entre 90-100 µg de proteínas por cada 200 µl de tejido. Una vez realizadas las diluciones se preparó la mezcla de reacción para incubación que contenía 200 µl de tejido, 20 µl de solución amortiguadora de fosfatos o sulfato de atropina (P.M 289.4) que se utilizó como inhibidor competitivo de receptores muscarínicos, y 20 µl de [³H]-QNB (actividad específica 44.9 ci/mmol), preparado previamente con etanol a una concentración de 8nM para determinar la unión de ligando-receptor. Todo lo anterior se preparó y se mantuvo en hielo hasta agregar el [³H]-QNB, entonces se colocó el tubo de reacción en un baño de agitación a 25 °C donde se incubó por 1 h ; la reacción se detuvo por lavados y filtración en un sistema con vacío. Se realizaron 3 lavados con 2.5 ml cada uno de la solución amortiguadora, que fueron depositados en el sistema de filtración de 12 vías (Mannifold). Inmediatamente, los filtros fueron recuperados y depositados en viales con 5 ml de líquido de centelleo. La radiactividad retenida por los filtros se cuantificó

en un contador beta Beckman LS 65000. Se tomaron controles de las diluciones del [³H]-QNB 20 µl para verificar la preparación, así como la estabilidad del compuesto. La unión específica de [³H]-QNB a receptores muscarínicos se definió como la unión total menos la unión inespecífica obtenida en presencia de sulfato de atropina en una concentración de 100 mM. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La concentración de proteínas se determinó en alícuotas de las membranas en suspensión utilizadas en el ensayo por el método de Lowry y col 1951 (77). Los datos de unión se expresaron como Fmol de [³H]-QNB unidos específicamente por mg de proteínas por hora de incubación.(78)

ESTADÍSTICA :

Los resultados se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA), t- student. El nivel de aceptación fue de $p < 0.05$

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



RESULTADOS

PESO CORPORAL Y CEREBRAL.

Los resultados obtenidos mostraron una importante disminución ($p < 0.05$) del peso corporal en todas las edades estudiadas y en todos los grupos experimentales en relación al grupo T, mientras que al comparar el grupo H con los grupos M-L y **M** únicamente este último fue menor ($p < 0.05$) (fig 7).

El peso cerebral fue menor en los grupos H, M-L y **M** en relación al grupo T en todas las edades estudiadas ($p < 0.05$) (fig 8), así mismo los grupos M-L, y **M** fue menor con respecto al H a partir de los 21 hasta los 60 días de edad ($p < 0.05$) (fig 8).

Respecto al consumo de alimento entre los grupos estudiados, no hubo diferencias significativas, $T = 16.87 \pm 0.41$ gr/día; $H = 16.59 \pm 1.14$ gr/día, y **M** = 14.75 ± 1.86 gr/día.

ACTIVIDAD DE COLINA ACETILTRANSFERASA (E.C. 2.3.1.6)

CORTEZA FRONTAL

Los resultados mostraron que la actividad de CAT en el grupo H fue significativamente mayor a los 21 y 30 días de edad en relación al grupo T ($p < 0.05$) (fig 9). En el grupo **M** esta elevación se observó en todas las edades estudiadas respecto al grupo T ($p < 0.05$) (fig 9), mientras que el grupo M-L mostró una disminución en la actividad de la CAT en todas las edades respecto tanto al grupo T como al **M** ($p < 0.05$) (fig 9), en cambio en relación con el grupo H, esta solo fue menor a los 21 y 30 días de edad ($p < 0.05$) (fig 9).

HIPOCAMPO

En esta región los resultados mostraron una mayor actividad de CAT a los 14, 21 y 60 días de edad en el grupo H respecto al T ($p < 0.05$) (fig 10), mientras que el grupo M-L mostró una reducción significativa en la actividad de la enzima en relación al grupo T en todas las edades estudiadas ($p < 0.05$) (fig 10). En el grupo **M** se observó un incremento significativo a los 21 días de edad respecto al T ($p < 0.05$), mientras que los 30 y 60 días de edad, fue significativamente menor ($p < 0.05$) (fig 10), sin embargo a los 14, 21 y 30 días de edad la actividad de la enzima fue significativamente mayor en el **M** respecto al grupo M-L ($p < 0.05$) (fig 10) y a los 60 días de edad el grupo **M** mostró menor actividad de CAT respecto al M-L ($p < 0.05$) (fig 10), así como a los 21 y 60 días respecto al H ($p < 0.05$) (fig 10).

CUANTIFICACIÓN DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS POR UNIÓN [³H]-QNB

CORTEZA FRONTAL.

Los resultados obtenidos en esta región (fig 11) muestran una reducción estadísticamente significativamente en la unión de [³H]-QNB a receptores en todos los grupos experimentales y edades estudiadas, en relación al grupo T ($p < 0.05$), excepto a los 60 días en el grupo H y **M** (fig 11). Al comparar el grupo H con el M-L, se observó disminuido a los 21 días, efecto similar a los 30 en el grupo M-L respecto al **M** ($p < 0.05$). El patrón de unión de [³H]-QNB en los grupos experimentales se mostró con un retardo durante la segunda a la tercera semana, y alcanzó la unión máxima de [³H]-QNB alrededor de los 30 días de edad, mientras que el desarrollo del grupo T se observó constante desde los 14 días de edad (fig 11).

HIPOCAMPO.

En esta región se observó una reducción en la unión de [^3H]-QNB en todos los grupos experimentales en relación al grupo T a las edades de 14 y 21 días ($p < 0.05$) (fig 12). A los 30 días el grupo H mostró una unión significativamente mayor en relación a los grupos T, **M** y M-L ($p < 0.05$), mientras que a los 60 días el patrón de unión fue mayor en el grupo **M** en relación al T ($p < 0.05$) (fig 12)

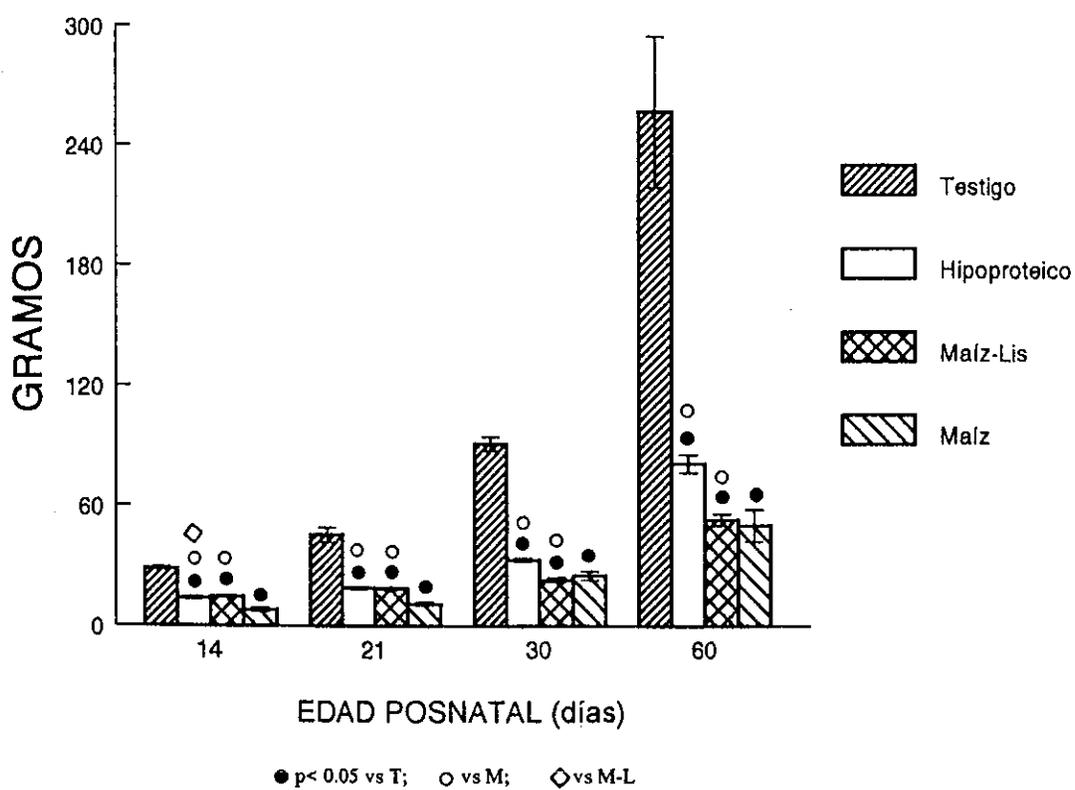


Figura 7

Peso corporal expresado en gramos durante el desarrollo de las ratas alimentadas con diferentes dietas ; testigo (T), hipoproteica (H), maíz (M), y maíz- lisina(M-L). Los resultados representan la media \pm la desviación estándar.

n= 6-10 animales.

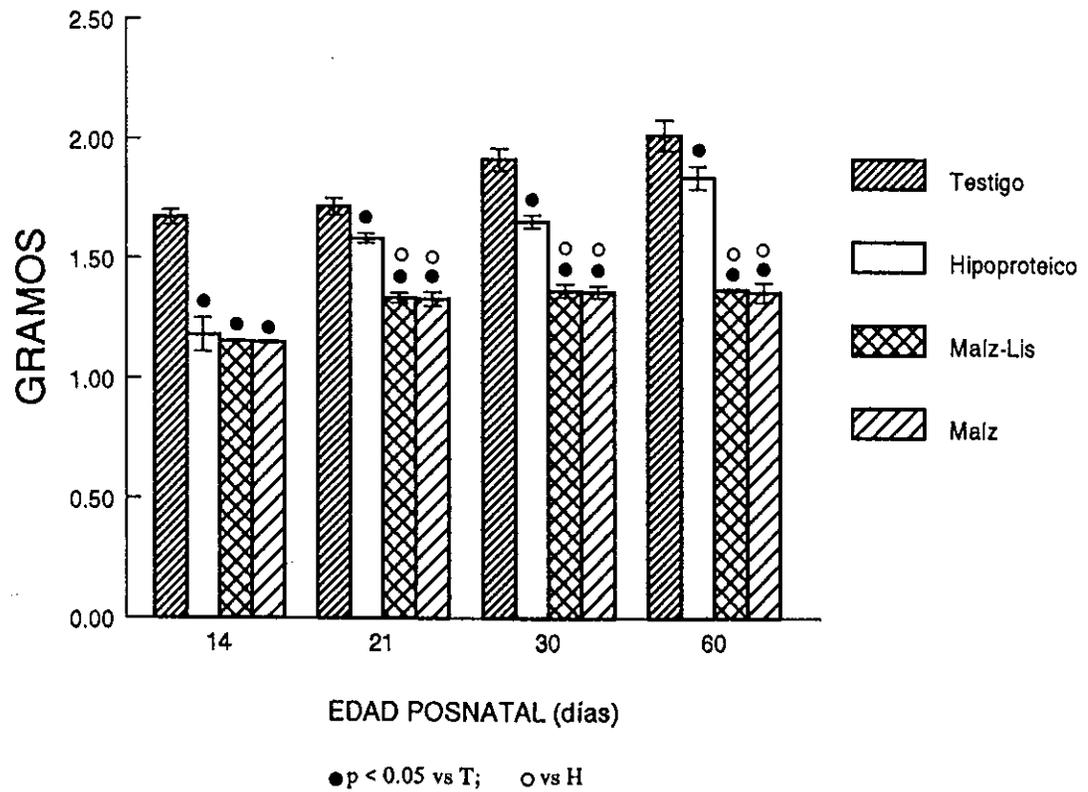


Figura 8

Peso cerebral expresado en gramos durante el desarrollo de las ratas alimentadas con diferentes dietas ; testigo (T), hipoproteica (H), maíz (M), y maíz- lisina(M-L). Los resultados representan la media \pm la desviación estándar..

n= 6-10 animales

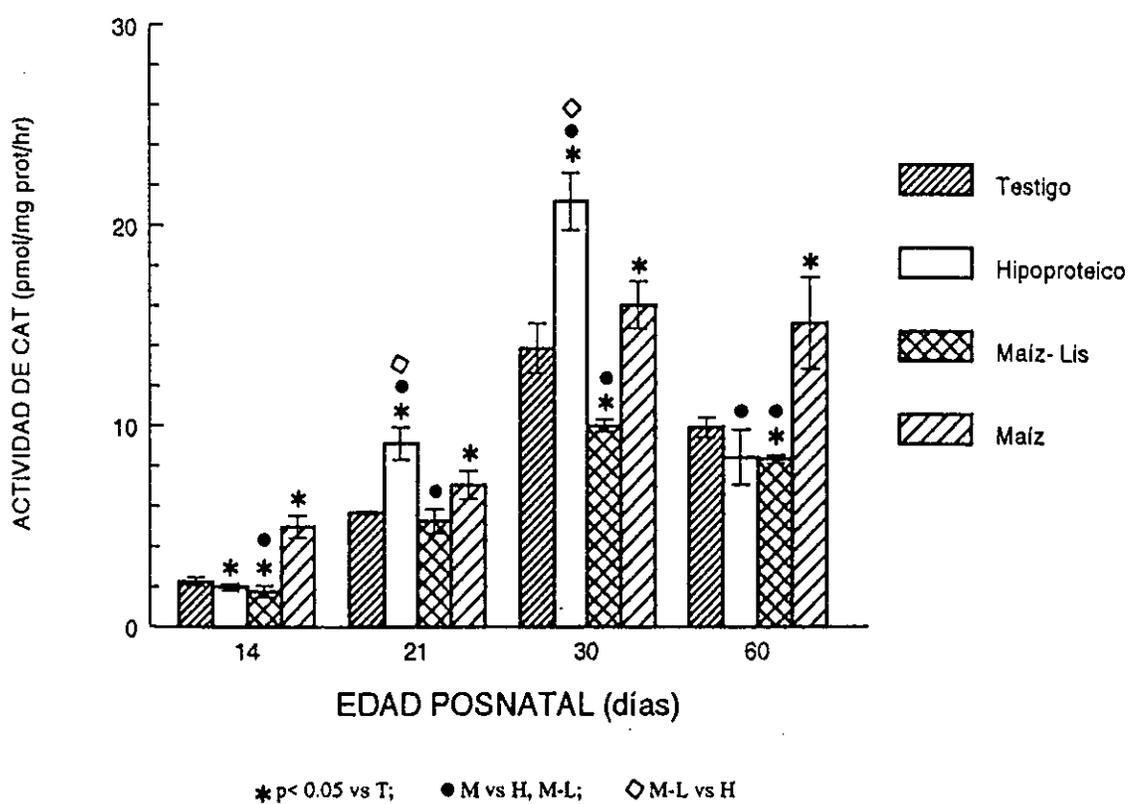


FIGURA. 9

Actividad de CAT (E.C. 2.3.1.6.), (expresada en pmol/mg prot/hr) en corteza frontal de ratas alimentadas con diferentes dietas; testigo (T), hipoproteica (H), maíz (M), y maíz- lisina (M-L), en las diferentes edades estudiadas. Los resultados representan la media \pm la desviación estándar. Las determinaciones fueron por triplicado de 4-6 experimentos.

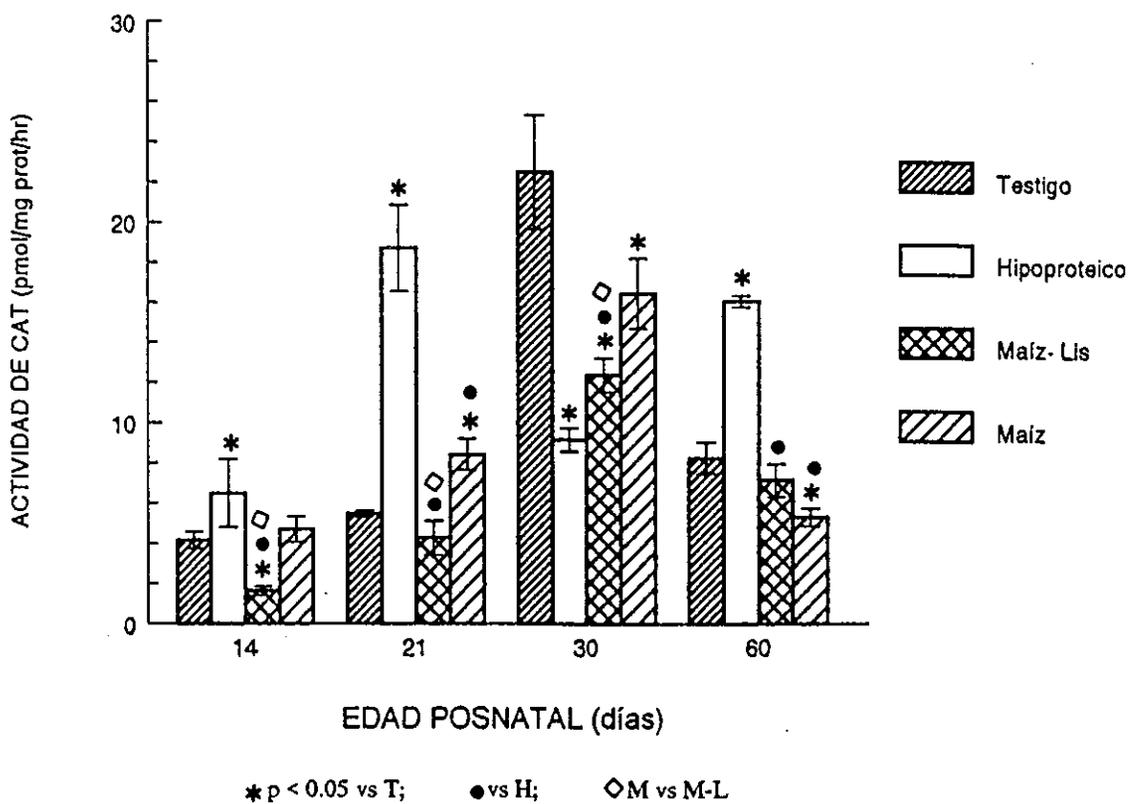


FIGURA 10

Actividad de CAT (E.C. 2.3.1.6.), (expresada en pmol/mg prot/hr) en el hipocampo de ratas alimentadas con diferentes dietas; testigo(T), hipoproteica (H), maíz (M), y maíz-lisina (M-L), en las diferentes edades estudiadas. Los resultados representan la media \pm la desviación estándar. Las determinaciones fueron por triplicado de 4-6 experimentos.

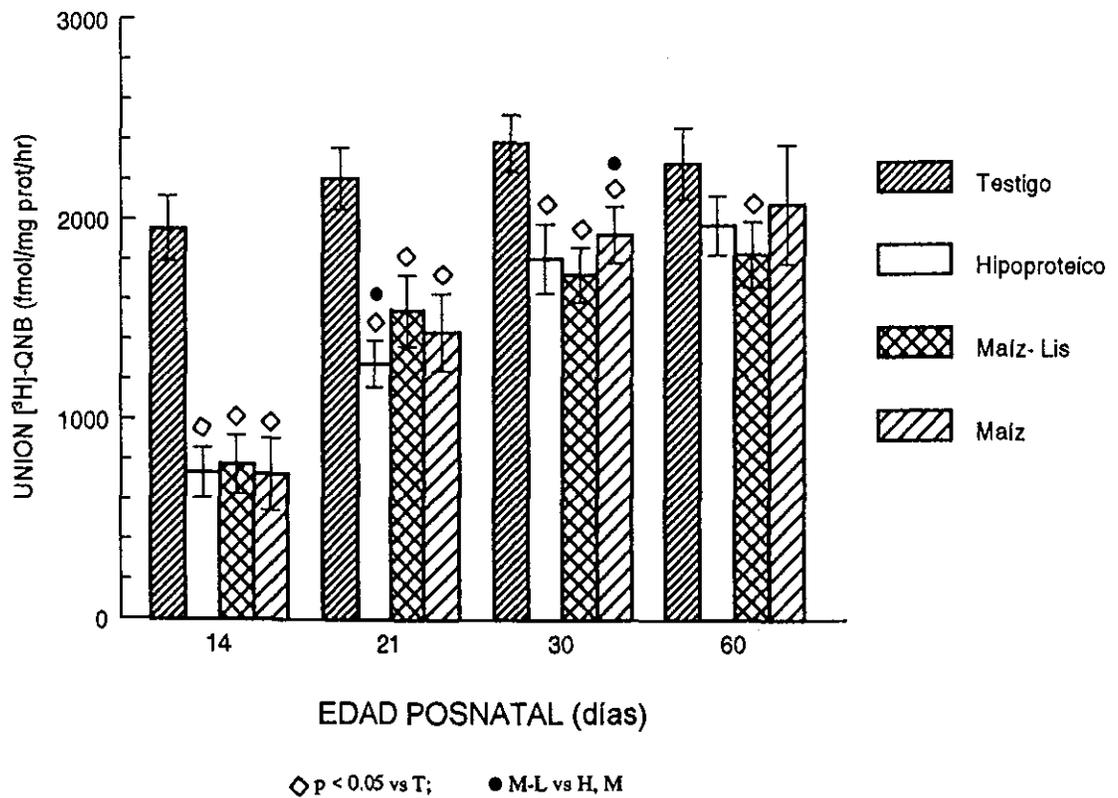


FIGURA 11

Unión de [³H]-QNB a receptores muscarinicos, (expresada en fmol/mg prot/hr) en corteza frontal de ratas alimentadas con diferentes dietas ; testigo(T), hipoproteica (H), maíz (M), y maíz-lisina (M-L), en las diferentes edades estudiadas. Los resultados representan la media ± la desviación estándar. Las determinaciones fueron por triplicado de 4-6 experimentos.

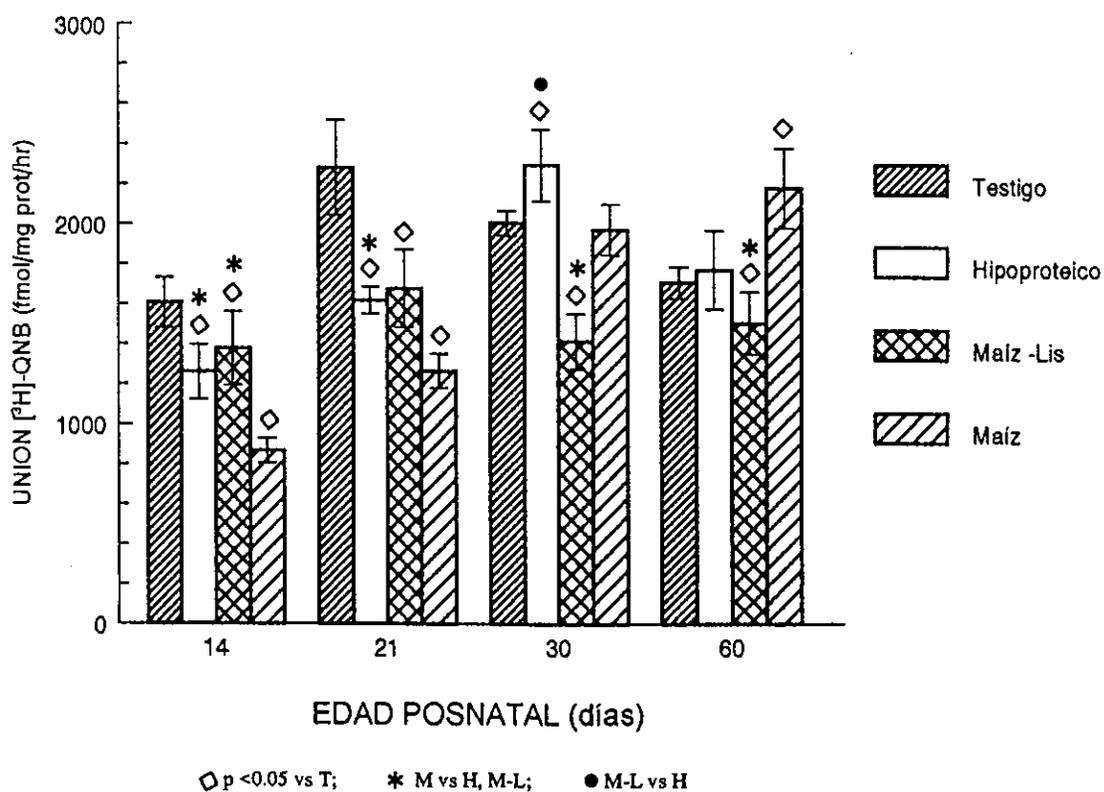


FIGURA 12

Unión de $^3\text{H}\text{-QNB}$ a receptores muscarínicos, (expresada en fmol/mg prot/hr) en hipocampo de ratas alimentadas con diferentes dietas; testigo (T), hipoproteica (H), maíz (M), y maíz-lisina (M-L), en las diferentes edades estudiadas. Los resultados representan la media \pm la desviación estándar. Las determinaciones fueron por triplicado de 4-6 experimentos.

DISCUSION

La disminución significativa en el peso corporal y cerebral que se encontró en los grupos experimentales, desde el nacimiento de las camadas, refleja los efectos de la desnutrición. A pesar de que la madre sujeta a restricción de nutrientes mantiene con sus reservas a los productos, éstos se ven afectados tanto en su peso como en el desarrollo de los diferentes sistemas. La disminución del peso corporal en los grupos experimentales es una respuesta a la restricción de proteínas y al alto contenido en carbohidratos en las dietas administradas, al tomar en cuenta que el requerimiento mínimo de proteína en la rata es de un 12% (79) y en este caso solo se administró el 8% de proteína, con un 20% más en el contenido de carbohidratos, esto podría estimular la liberación de insulina, y favorecer la captura de aa para la síntesis de proteínas musculares. Al disminuir los aa en el suero, el organismo tiende a obtenerlos por degradación del tejido corporal e inducir disminución de peso corporal en ratas jóvenes y pérdida de proteínas en las adultas (80). La disminución de los aa esenciales Lis y Trp en la alimentación a base de maíz en nuestro estudio, induce retardo en el crecimiento, a pesar de que este tipo de alimentación aporta 25 mg de Lis y 6 mg de Trp por gramo de proteína en la dieta y el requerimiento mínimo de estos aa en la rata es de 21 y 7 mg/gr de proteína en la dieta respectivamente (81), al parecer no existe una verdadera deficiencia de aa que condicione una disminución en la síntesis de proteínas, aunque debe considerarse que, mientras la dieta T, aporta un 0.28% de Trp, las dietas H y M aportan solamente el 0.1 y 0.048% respectivamente (82).

Por otro lado, la disminución de Trp en la dieta, reduce la secreción de la hormona del crecimiento y la síntesis de proteínas en el hígado (80, 83) lo que se refleja en la disminución de peso observado en estos animales. Del mismo modo, se ha reportado que la restricción de alimento y la restricción de proteínas, inducen un retardo en el periodo de división celular y en la síntesis de proteínas que provoca una disminución en el desarrollo de los órganos en estos animales (84), entre los

que se encuentra el cerebro en donde se han inducido una amplia variedad de disfunciones que pueden llegar a ser permanentes tales como retardo en el crecimiento del cerebro, daño neuronal y glial que repercuten en la formación de circuitos entre las neuronas, así como efectos en la síntesis, captura y liberación de diversos neurotransmisores por una deficiencia de aa precursores en la dieta (33,85,86,87). Lo que demuestra la importancia de contenido proteico en la alimentación. En nuestro estudio no hubo diferencias significativas en el consumo de alimento en los grupos experimentales H, *M* y M-L , respecto al T.

Ahora bien, tanto el tiempo de aplicación de la desnutrición como el tipo de restricción que se aplica en los animales, es de gran importancia para que se vean afectados de manera diferenciada, regiones cerebrales específicas o sistemas de neurotransmisión particulares. En este sentido los resultados del presente trabajo mostraron un aumento significativo de la actividad de la CAT ante la disminución de proteínas en la dieta tanto en la corteza frontal como en el hipocampo, mientras que la deficiencia de TRP en la dieta de maíz disminuyo la actividad de la enzima en relación al grupo H, y se mantuvo significativamente sobre los niveles del grupo T principalmente en corteza. Estos resultados nos sugieren que el aumento en la actividad de CAT puede estar relacionado con una desinhibición de las neuronas colinérgicas sobre la síntesis de AC, inducida por los diferentes niveles de 5-HT, ya que se ha demostrado que la restricción proteica eleva los niveles de 5-HT cerebrales y la alimentación a base de maíz disminuye la síntesis de este neurotransmisor (88, 89, 90).

Así mismo se ha demostrado que las fibras serotoninérgicas tienen un efecto inhibitor sobre las terminales colinérgicas tanto septales como sobre aquellas procedentes del núcleo basal magnocelular aferentes al hipocampo y a la corteza cerebral respectivamente (8, 4), y se ha demostrado que cuando se lesiona del sistema serotoninérgico, disminuye la 5-HT y se eleva significativamente la síntesis de AC tanto en la corteza frontal y en el hipocampo (59, 91). Samarin y col.(92) demostraron que al aplicar agonistas a 5-HT, se indujo un incremento de AC en hipocampo y cuerpo estriado. De manera similar se ha demostrado la

interacción entre ambos sistemas en la mediación de la excitación electrocortical y en el ritmo teta (θ) hipocampal (58) y si se bloquean ambos sistemas simultáneamente se inducen severos daños en el aprendizaje en pruebas que requieren de memoria de corto y largo plazo (93).

Por otra parte se ha reportado que la activación de los receptores tipo 5-HT_{1A} localizados en hipocampo y corteza cerebral inducen la liberación de AC en el hipocampo de ratones y cobayos (62), y que los 5-HT₃ la inhiben (94). Así mismo al bloquear los receptores 5-HT₂ se induce un aumento en la liberación de AC, ahora bien este aumento no se observa si además se dañan las vías dopaminérgicas(91). De manera similar se ha observado que la 5-HT endógena facilita la liberación de AC a través de la activación de los receptores 5-HT_{1B} en corteza frontal, (95) y se ha demostrado que la activación de los receptores 5-HT_{1A} estimula la liberación de Dopamina (DA), la cual actúa sobre los receptores D₁ que a su vez estimula la liberación de AC en corteza frontal (96).

Esto sugiere la importancia de los niveles adecuados de 5-HT sobre la regulación del sistema colinérgico a través de activación de los diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos estimulando o inhibiendo la actividad de este sistema. Sin descartar la posibilidad de que la 5-HT pueda actuar indirectamente sobre interneuronas colinérgicas, a través de la activación con otros sistemas de neurotransmisores tales como DA.

Ahora bien, el aumento de la actividad de CAT que se observó en los grupos H y **M** en relación al T durante el desarrollo, podría ser un reflejo de cambios plásticos estructurales de interneuronas colinérgicas, en el afán de mantener su estabilidad funcional, así se ha demostrado en un modelo animal, que la restricción de Trp en la dieta, induce mayor eficiencia en pruebas que requieren memoria de corto plazo (50), correlativamente con un incremento en la longitud dendrítica y en el número de espinas de neuronas piramidales de corteza prefrontal (51).

Por otra parte se ha demostrado que el transportador de AC se encuentra elevado en las etapas embrionarias, alcanzando sus valores máximos a los 14

días postnatales y desciende a partir de los 35 a los 60 días de edad (97) . Así mismo la actividad de CAT se encuentra baja durante las primeras etapas del desarrollo embrionarias y se incrementa en las primeras cuatro semanas posnatales (98,99), efecto similar al observado en el presente estudio en los grupos testigos. Sin embargo a pesar de que se observa este mismo patrón de desarrollo en los grupos experimentales, éstos mostraron un incremento en la actividad de CAT en corteza frontal, mientras que en el hipocampo el desarrollo de la actividad de la enzima se observó mas temprano en el grupo H, en relación al grupo T.

Estudios realizados por Represa y col (100), observaron un retardo en la actividad de la CAT en CA1, CA3 y giro dentado en hipocampo durante el desarrollo de ratas previamente sujetas a retardo en el crecimiento intrauterino, por otra parte Wiggins y col (86), describieron que la actividad de la CAT disminuye significativamente en bulbo olfatorio, hipotálamo y principalmente en tallo cerebral en los animales desnutridos durante la lactancia sin que se recupere su actividad al administrar una dieta normal. Rocha y col (74) demostraron que la restricción de alimento desde la gestación induce un aumento en la enzima ACE en cerebelo cuerpo estriado e hipotálamo. Sin embargo, al administrar una dieta restringida en proteínas se observó por un lado disminución de la actividad de la ACE en corteza frontal y por otro un incremento de la misma en tallo cerebral (101).

Ahora bien, cuando a la dieta de maíz se le administra lisina la actividad de la CAT mostró un desarrollo semejante al grupo T durante todo el estudio en ambas regiones, lo que nos podría sugerir que al equilibrar el contenido de aa para la síntesis de la enzima, ésta trata de mantener su función normal, sin llegar a recuperarse totalmente, posiblemente por el efecto de la deficiencia proteica inducida desde la gestación. Además se ha demostrado que la lisina es importante para la síntesis de la enzima ya que contiene 6 % de este aminoácido y solo 0.05% de TRP(102).

Por otra parte se ha demostrado que la inducción de daño a las neuronas colinérgicas ya sea farmacológicamente o por desnutrición, altera tanto la actividad

de CAT como los sitios de unión de receptores muscarínicos (103). Este tipo de receptores se encuentran disminuidos al nacimiento e incrementan durante las primeras 4 semanas de edad en corteza frontal y en el hipocampo de las ratas (104), Aubert y col. (97) demostraron que la densidad de receptores M1 y M3 es alta durante la 3er. y 5ta semana posnatal, mientras que los M2 así como los sitios de captura de colina de alta afinidad aparecen después de la 5ta. semana posnatal. Sin embargo a pesar de que se observa este mismo desarrollo en los grupos experimentales, estos mostraron una menor cantidad de sitios de unión a receptores muscarínicos. Lo que sugiere que posiblemente hay un retraso en el desarrollo del sistema colinérgico relacionado con una disminución en el número de células así como en las conexiones sinápticas inducido por la desnutrición impuesta desde la etapa gestacional y durante el desarrollo postnatal, pues se ha demostrado que la neurogénesis del sistema colinérgico inicia en la etapa embrionario y después de una semana posnatal se establecen los contactos sinápticos, etapa en la cual inicia la maduración de este sistema (99).

Así mismo, se ha demostrado que la restricción proteica pre y posnatal induce un retraso en la ontogenia de estos receptores en corteza frontal y una disminución en la densidad de M2 tanto en la etapa de lactancia como en la edad adulta (105, 106), al igual que una reducción en la unión de receptores muscarínicos en el hipocampo (100), cuerpo estriado e hipotálamo (86), corteza motora y somatosensorial (104). Así las alteraciones en la actividad de CAT y los sitios de unión de receptores muscarínicos, se han puesto de manifiesto al inducir daño a las neuronas colinérgicas, ya sea farmacológicamente ó por desnutrición, si ésta se aplica en etapas tempranas de la vida.

Al analizar ambos marcadores colinérgicos en nuestro estudio, se observó una respuesta inversamente proporcional, ya que, cuando la actividad de CAT aumentaba en los grupos restringidos, la unión de receptores disminuía, tanto a través del desarrollo como por efecto de la dieta en ambas regiones estudiadas. Este hecho, permite pensar en una disminución de la población neuronal colinérgica ya que el aumento en la actividad de CAT induciría a una elevación de AC que no

podría ser captada por un número elevado de receptores. Estos hechos aunados a los resultados obtenidos en este estudio, permiten mostrar que las alteraciones producidas en los niveles de serotonina cerebral, afectan tanto el comportamiento bioquímico como fisiológico del sistema colinérgico, ya que se ha determinado que la restricción de Trp en la alimentación, modifica la actividad de la enzima que sintetiza al neurotransmisor AC, reduce el número de sitios de unión del receptor, hechos que se relacionan con alteraciones en la forma y número de espinas dendríticas en hipocampo y se correlacionan con alteraciones en el desarrollo de pruebas de aprendizaje (49, 50, 51).

Por lo que los cambios observados en la actividad de CAT en los diferentes grupos estudiados podría ser una respuesta temporal a la capacidad enzimática ó bien a un aumento de la afinidad de la enzima por el sustrato, lo que seria interesante demostrar con estudios posteriores.

CONCLUSIONES

- 1.- Tanto la restricción proteica como de triptofano en la dieta reducen significativamente el peso corporal y cerebral.
- 2.- La restricción proteica induce un aumento en la actividad de Colina acetiltransferasa lo que sugiere un reflejo de mecanismos plásticos involucrados en una mayor transmisión sináptica
- 3.- El aumento en la actividad de Colina acetiltransferasa inducida por la deficiencia de triptofano en el grupo alimentado con la dieta de maíz, sugiere una desinhibición en la regulación de la actividad del sistema colinérgico.
- 4.- La regulación en la actividad de la Colina acetiltransferasa observado en el grupo alimentado con la dieta de maíz, suplementada con lisina indica la importancia del contenido de este aminoácidos para la síntesis de la enzima.
- 5.- La disminución de la unión del [³H]-QNB a receptores muscarínicos observados en los grupos hipoproteicos indica una menor concentración de receptores.
- 6.- La disponibilidad de triptofano, y por consiguiente de serotonina cerebral, modifica el patrón de la actividad de Colina acetiltransferasa y la cantidad de receptores muscarínicos a las edades de 14, 21, 30 y 60 días de edad en corteza frontal y en el hipocampo.

REFERENCIAS

- 1.- Brown, L. J., y Pllitt, E (1996) Malnutrition, Poverty and Intellectual Developmental. **Sci Am.** 269 : 30- 37
- 2.- Morgane, P. J., Austin- Lafrance, R., Brozino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., y Galler, R.J. (1993). Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. **Neurosci Biobehav Rev.** 17 : 91-128.
- 3.- McEntee, W.J., y Crook, T.H.(1991) Serotonin, Memory, and the Aging Brain. **Psychopharmacol.** 103 : 143-149.
- 4.- Quirion, R., Richard, J., y Dam, T.V. (1985). Evidence for the existence of serotonin type-2 receptors on cholinergic terminals in rat cortex. **Brain Res,** 333 : 345-349.
- 5.- Bigl, V., Woolf, N.J., y Butcher, L.L.(1982) Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parental, temporal, occipital and cingulate cortices : a combined fluorescent tracer and acetylcholineesterase analysis. **Brain Res. Bull.,** 8 : 727-749
- 6.- Steinbusch, H.W.M.(1981). Distribution of serotonin- immunoreactivity in the central nervous system of the rat- cell bodies and terminals. **Neurosci.** 6 : 557-618.
- 7.- Riekkinen, Jr. P., Sirvio, J., y Riekkinen, P. (1990). Interaction between raphe dorsalis and nucleus basalis magnocellularis in spatial learning. **Brain Res.** 527 : 342-345.
- 8.- Samanin, R., Quattrone, A., Peri, G., Ladinsky, H., y Consolo, S. (1978). Evidence of an interaction between serotoninergic and cholinergic neurons in the corpus striatum and hippocampus of the rat brain. **Brain Res.** 151 : 73-82.
- 9.- Normile, H.J., y Altman, H.J. (1990). Effects of combined acetylcholinesterase inhibition and serotoninergic receptor blockade on age associated memory impairments in rats. **Neurobiol Aging.** 13 : 735-740.

- 10.- Levitsky, A. D., Barnes, R. H. (1972). Nutritional and environmental interactions in the development of the rat : Long -Term effects. **Scientia**. 176 : 68-71
- 11.- Schliebs, R., Beas, Z. C. (1990). Receptores colinérgicos en el cerebro de mamíferos. **Scientia**. 41 : 287-296.
- 12.- Cooper, J.R., Bloom, F.R., Roth, R.H. (1982). The biochemical basis of neuropharmacology. **4to ed, Oxford University Press, U.S.A.** pp. 77-108
- 13.- Martinez- Murillo, R., Villalba, M.R., Rodrigo, J. (1990). Immunocytochemical Localization of Cholinergic Terminals in the Region of the Nucleus Basales Magnocellularis of the Rat : A Correlated Light and Electron Microscopic Study. **Neurosci** 36 : 361-376.
- 14.- Lewis, A.D. (1991). Distribution of Choline Acetyltransferase, Immunoreactive Axons in Monkey Frontal Cortex. **Neurosci** 40 : 363-374.
- 15.- Taylor, P., y Brown, H.J. (1994). Acetilcholine (chapter 11) en : Basic Neurochemistry (George .J.S., Bernard, W.A.R., wayner, A., Perry, B.M.P,edts), **5ta ed Raven Press New York**. pp. 63-85
- 16.- Shellebs, R ; Zavin, M ; Steinbach, J ; y Rother, T. (1989). Changes in cholinergic but not in GABAergic markers in amygdala, piriform cortex, and nucleus basalis of the rat brain following systemic administration of kainic acid. **J. Neurochem**. 53 : 212-219
- 17.- Karlin, A., (1991) Explorations of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. **Harvey Lect**. 85 : 71- 109.
- 18.- Wamley, J.K., Gehler. D.R., Roeske, w.R., Yamamura, H.I. (1984). Muscarinic antagonist binding site heterogeneity as evidenced by autoradiography after direct labeling with [³H]-QNB and [³H]- pirenzepine. **Life Sci**. 34 : 1395-1402.
- 19.- Dawson, V.L., Wamsle, J.K.(1990).Hipocamapal Muscarinic hypersensitivity after AF64A medial septal lesion excludes M1 receptors.**Brain Res Bull** 25 : 311-317.

- 20.- Vilaro, M.T. Wiederhold, K.H., Palacios, J.M., Mangod, G. (1992). Muscarinic M2-selective ligands also recognize M4 Receptors in the Rat Brain: Evidence from Combined in situ Hybridization and Receptor Autoradiography. **Synapse** 11 : 171-183.
- 21.-Quirion, R., Aubert, I., Araujo, D.M., Hersi, A., Guadreau, P. (1993). Autoradiographic distribution of putative muscarinic receptor sub-types in mammalian brain. **Prog. Brain Res.** 98 : 85-93
- 22.-Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E y Brann, M.R. (1991). Antagonist Binding of Five Cloned Human Muscarinic Receptor Subtypes. **J. Pharmacol Exp Ther.** 256 : 727-733.
- 23.- Levey , A.I., Edmunds, S.M., Heilman, C.J., Desmond, T.J., y Frey, K.A. (1994). Localization of Muscarinic m3 Receptor Protein and M3 receptor binding in Rat Brain. **Neurosci** 63 : 207-221.
- 24.- Buckley, N.J., Bonner, T.I., Buckley, C.M., Brann, M.R.(1989). Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. **J. Neurosci.** 8 : 4646-4652.
- 25.- Dorje F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E., Brann, M.R (1991). Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 256 : 727-733.
- 26.- 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. **Neurochem In.** 6 : 163-82.
- 27.- Wainer, B.H., y Mesulam, M.M (1990). Ascending Cholinergic Pathway in the Rat Brain in : brain Cholinergic system. /Steroid, M. y Besold, D., eds). **Oxford University Press, New York**, pp. 65-119.
- 28.- Peters, J.C. (1991) Tryptophan nutritional and metabolism : An overview. **Adv. Exp. Med. Biol.** 194 : 345-358.
- 29.- Young, S.N. (1996). Behavioral effects of dietary neurotransmitter precursors : basic and clinical aspects. **Neurosci and Biobeha. Rev.** 20 (2) : 313-323.

- 30.- Wilson , M.A., y Molliver. M.A.(1991). The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates : Retrograde transport studies. **Neurosci.** 44 (3) : 555-570
- 31.- Nagahiro, S ; Diksic, M ; Yamamoto, Y.L ; Rimel, H. (1990). Non-invasive in-vivo autoradiographic method to measure axonal transport in serotonergic neurons in the rat brain. **Brain Res.** 506 : 120-128.
- 32.-Manter y Gatz's (1987). Essentials of clinical neuroanatomy and neurophysiology (Eid Gilman Sarah Winasna Newman) **Edt 7 F.A. Davis Company.** pp. 203-223.
- 33.-Noback. R.Ch. ,y Demarest, J.R.(1980) Sistema nervioso humano .Fundamentos de Neurobiologia. **Ed McGraw Hill,México,** pp. 1-421.
- 34.-López, A.(1983) Anatomía funcional del sistema nervioso, **Ed. Limusa México,** pp. 5-633
- 35.-Barnes, C.A., Mcnaughton, B.L (1985). An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. **Behav. Neurosci.** 99 : 1040-1048.
- 36.- Shen , Y., Specht, S .M., De Saint Ghislain, I., Li, R. (1994).The hipocampus : A biological model for estuding learning and memory. **Prog. Neurobiol.** 44 : 458-496.
- 37.- Deutsch, J. A. (1975). The cholinergic synapse and the site of memory. **Science** 174 : 788-94
- 38.- Plotkin, D.A. y Jarvik, L.F. (1986). Cholinergic dysfunction in Alzheimer disease : cause or effect ?. **Prog Brain Res** 65, 91-103.
- 39.- Coyle, J.T., Price, D.L y DeLong, M.R (1983). Alzheimer's disease : a disorder of cortical cholinergic inervation. **Science.** 219 : 1184-1190.
- 40.- Nagai, T., Mc Geer,P.L., Peng, J.H., McGeer,E.G., y Dolman, C.E. (1983). Choline acetyltransferasa immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls. **Neurosci. Lett.** 36 : 195-199

- 41.- Lechericy, S., Hirsch, E.C., Cervera, P., Hersh, L.B., Hauw, J.J. (1989). Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum of patients with Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 : 8580-8584.
- 42.- Luine, V ; y Hearn, M. (1990). Spatial memory deficits in aged rats : contributions of the cholinergic system assessed by ChAT. *Brain Res.* 523 : 321-324.
- 43.- Vanderwolf, C.H., (1987). Near-total loss of ' learning and memory ' as a result of combined cholinergic and serotonergic blockade in the rat. *Behav.* 23 : 43-57.
- 44.- Wenk, G.L ; Markowska, A.L ; y Olton, D. S (1989). Basal forebrain lesions and memory : alterations in neurotensin, not acetylcholine, may cause amnesia. *Behav. Neurosci.* 103 : 765-769.
- 45.- Asin, K.E ; Wirtshafter, D, y Fibinger, H. C (1985). Electrolytic, but not 5-7-dihydroxytryptamine, lesions of the nucleus medianus raphe impair acquisition of a radial maze task. *Behav. Neural Biol.* 44 : 415-424.
- 46.- Richter- Levin, G ; y Segal, M. (1991) The effects of serotonin depletion and raphe grafts on hippocampal electrophysiology and behavior. *J. Neurosci.* 11 : 1585-1596.
- 47.- Ogren, S.O. (1985) Central serotonin neurones in avoidance learning interactions with noradrenaline and dopamine neurones. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 23 : 107-123
- 48.- Olvera-Cortez, E., Perez-Vega, M.I., Barajas -López, G., Del Angel-Meza, A.R., González-Burgós, I., y Feria-Velasco, A. (1998). Place learning impairment in chronically tryptophan-restricted rats. *Nutritional neurosci,* 1 : 223-235.
- 49.- Perez-Vega, M.I., Barajas-López, G., Del Angel-Meza, A.R., González-Burgós, I., y Feria-Velasco, A. (1998). Dendritic spine density of pyramidal neurons in field CA1 of the hippocampus decreases due to chronic tryptophan restriction. *Nutritional neurosci* 1 : 237-242.

- 50.- González-Burgós, I., Perez-Vega., Del Angel-Meza, A.R y Feria-Velasco, A. (1998). Effect of tryptohan restriction on short-term memory. *Physiol. Behav.* 63 (2) : 11165-169.
- 51.- González-Burgós, I., Del Angel-Meza, A.R., Barajas-López, G., y Feria-Velasco, A. (1996) Tryptohan restriction cause long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *Int. J. Devl Neurosci*, 14 (5) : 673-679.
- 52.- McEntee, W.J ; Crook, T.H. (1991) Serotonin, memory, and the aging brain. *Psychopharmacol.* 103 : 143-149.
- 53.- Sakurai, Y. , y Wenk, L.G. (1990). The interaction of acetylcholinergic and serotonergic neural systems on performance in a continuous non-matching to sample task. *Brain Res.* 519 : 118-121.
- 54.- Nilsson, O.G., Strecker, R.E., Daszuta, A., Bjorklund, A. (1988). Combined cholinergic and serotonergic denervation of the forebrain produces severe deficits in a spatial learning task in the rat. *Brain Res* 453 : 235-246.
- 55.- Cassel, J.C., Neufang, B., Kelche, C., Aiple, F., Will, B.E., Hertting, G., y Jackisch, R. (1992). Effects of septal and/ or raphe cell suspension grafts on hippocampal choline acetyltransferase activity, high affinity synaptosomal uptake of choline and serotonin, and behavior in rats with extensive septohippocampal lesions. *Brain Res.* 585 : 243-254.
- 56.- Cassel, J.C., Neufang, B., Kelche, C., Jeltsch,H., Will, B.E., Hertting, G., y Jackisch, R. (1993). Effects of grafts containing cholinergic and / or serotonergic neurons on cholinergic, serotonergic and noradrenergic markers in the denervated rat hippocampus. *Brain Res* 604 : 53-63.
- 57.- Nilsson, O.G., Brundin, P., y Bjorklund, A.(1990). Amelioration of spatial memory impairment by intrahipopcampal grafts of mixed septal and rape tissue in rats with combined cholinergic and serotonergic denervation of the forebrain. *Brain Res.* 515 : 193-206.

- 58.- Vanderwolf, C.H., y Baker, G.B. (1986). Evidence that serotonin mediates non-cholinergic neocortical low voltage fast activity, non-Cholinergic hippocampal rhythmical slow activity and contributes to intelligent behavior. **Brain Res.** 374 : 342-356-
- 59.- Robinson, S.E. (1982) Effect of specific serotonergic lesions on cholinergic neurons in the hippocampus, cortex and striatum. **Life Sci.** 32 : 345-353.
- 60.- Honda, T., y Semba, K. (1994). Serotonergic synaptic input to cholinergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. **Brain Res** 647 : 299-306
- 61.- Gage. F.H., y Bjorklund, A. Compensatory collateral sprouting of aminergic systems in the hippocampal formation following partial deafferentation. In R.L. Isaacson and K :H. Pribram. **Ed , The hippocampus, plenum, New York**, pp. 33-64
- 62.-Wilkinson. L.O ; Middlemiss. D. N, y Hutson. P.H. (1994) 5-HT_{1A} receptor activation increases hippocampal acetylcholine efflux and motor activity in the guinea pig : agonist efficacy influences functional activity in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 270 : 656-663.
- 63.- Venero. J.L ; Herrera. J.A ; Machado. A , y Cano. J. (1992). Changes in neurotransmitter levels associated with the deficiency of some essential amino acids in the diet. **Brit J. Nutri.** 68 : 409-420
- 64.- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper , T., Stern, W :C., Forbes, W., Hall,R., Brozino, J.D., Kissane,J., Hawrylemiez, E. y Resnick, O. (1978). The effect of protein malnutrition on the developing central nervous system of the rat. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 2 : 137-230
- 65.- Morgane, P. J., Austin- Lafrance, R., Brozino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., y Galler, R.J. (1993). Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. **Neurosci Biobehav. Rev.** 17 : 91-128.
- 66.- Rosso, P., (1990). Prenatal nutrition and brain growth. In : Van Gleder, N :M., Buttereorth, R.F., Drujan, B.D., Eds Malnutrition and the infant brain. **New York : Wiley-Liss .** , 25-40.

- 67.- Eckenhoff, M.F., Rakic, P.(1988). Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the *rhesus monkey*. **J. Neurosci.** 8 : 2729-2747.
- 68.- Bayer, S.C., y Altman, J. (1974). Hippocampal development in the rat. **J. Comp. Neurol.** 158 : 55-80
- 69.- Jordan, T.C., Howells, K :F., McNaughton, N., y Heatlie, P.(1982). Effects of early undernutrition on hippocampal development and function. **Res. Exp. Med.** 180 : 201-207.
- 70.- Lewis, P.D., Patel, J.A., y Blazs. R., (1979). Effects undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. **Brain. Res.** 168 : 186-189.
- 71.- Cintra, L., Díaz-Cintra, S., Galvan, A., Kemper, T., Morgane, P. (1990). Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. **Brain Res.** 532 : 271- 277.
- 72.- Díaz-Cintra, S., Ruiz, G.M., Corkidi, G Cintra, L. (1994). Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. **Brain Res.** 662 : 117-126.
- 73.- Singh, U.K., Ararwal, K.N. (1990). Acetylcholinesterase activity in developing rat brain during undernutrition. **Indian. J. Biochem. Biopsy.** 27 (5) : 329-31.
- 74.- Rocha, J.B.T., Emanuelli,T., Pereira, M.E. (1993). Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. **Acta. Neurobiol. Exp.** 53 : 431-437.
- 75.- Andrade, J.P., Barbosa, P.M.M. (1996). Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic systems of the hippocampal formation of adult rat : an immunocytochemical study. **Neurosci. Lett.** 211 (3) : 211-5.
- 76.- Fonnum, F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. **J. Neurochem.** 24 : 407-409.

- 77.- Lowry , O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193 : 265-276.
- 78.- Scheliebs, R., Zavin, M., Steinbach, J., y Rothe, T (1989). Changes in cholinergic but not in GABAergic markers in amygdala, piriform cortex, and nucleus basalis of the rat brain following systemic administration of Kainic acid. **J. Neurochem.** 53 : 212-219.
- 79.- Baker, J. H., Lindser, R.J., Weisbroth, H.S. (1985) The laboratory rat : Biology and disease. 1 : 123-152.
- 80.- Peters, J. C. (1991) Tryptophan nutrition and metabolism : An overview. **Adv. Exp.Med. Biol.** 294 : 345-358.
- 81.- Hegstead, D.M. (1973) The amino acid requirements of rats and human beings. In : Proteins in Human Nutrition (Porter, J.W.G. Rolls, B. A. eds). **Academic Press, London, U.K.**
- 82.- Del Angel, A.R., Beas-Zárate, C., Morales Villagrán, A. (1989) Effects of corn-feed and protein restriction on rat cerebellum and brain stem maturation. **Nutr. Rep. Inter.** 40 : 1119-1206.
- 83.- Rivest, R.W. (1991) Sexual maturation in female rats. **Exp.** 47 : 1027-1038.
- 84.- Winick, M. (1976) Malnutrition and brain development. **New. York, Oxford. University Press.** PP 45-46.
- 85.- Frankova, S. (1972) Effect of early dietary and sensoric reduction on behavior of adult rats. **Activ. Nern. Sup.** 14 : 1-7
- 86.- Wigginis, R.C., Fuller, G., Enna,S.J (1984) Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. **Life Sci.** 35 : 2085-2094.
- 87.- Rocha, J.B.T., Vedite, D. (1990) Effects of Undernutrition and handling during suckling on shuttle avoidance and footshock escape behavior and on plasma glucose levels of young rats. **Dev. Psychobiol.** 23 : 157-168.

- 88.- Chen, J.C., Turiak, G., Galler, J., Volicer, L. (1997) Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. *Int. J. Dev-Neurosci.* 15 (2) : 257-263.
- 89.- Hernández, R.J., Manjarréz, G.G., Chagoya, G. (1989) Newborn humans and rats malnourished in utero : Free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Res.* 488 : 1-13.
- 90.-Resnick, O., Morgane, P.J. (1984) Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severely protein malnourished rats . *Brain Res.* 303 : 163-170
- 91.- Jackson, D ; Bruno, P.J ; Stachowiak, K.M ; Zigmond, J.M. (1988) Inhibition of striatal acetylcholine release by serotonin and dopamine after the intracerebral administration of 6-hydroxydopamine to neonatal rats. *Brain Res.* 457 : 267-273.
- 92.- Samarin, R ., Quattrone, A., Peri, G., Ladinsky, H., Cosolo, S. (1978) Evidence of an interaction between serotonergic and cholinergic neurons in the corpus stratum and hippocampus of the rat bran. *Brain. Res.* 157 : 73-82.
- 93.- Vanderwolf, C.H. (1988) Cerebral activity and behavior : control by central cholinergic and serotonergic systems. *Int. Rev. Neurobiol.* 30 : 225-340.
- 94.- Consolo, S., Bertorelli, R., Russi, G. (1994). Serotonergic facilitation of Acetylcholine release in Vivo from rat Dorsal Hippocampus via Serotonin 5-HT₃ Receptors. *J. Neurochem.* 62 : 2254-2261
- 95.- Consolo, S., Arnaboldi, S., Ramponi, S., Nannini, L., Ladinsky, H., Baldi, G. (1996) Endogenous serotonin facilitates in vivo acetylcholine release in rat frontal cortex through 5-HT_{1B}. *Exp. Therapeutics.* 277 : 823-30
- 96.- Consolo, S., Ramponi, S., Ladinsky, H., Baldi, G.(1996) A critical role for D₁ receptors in the 5-HT_{1A}- mediated facilitation of in vivo acetylcholine release in rat frontal cortex. *Brain Res.* 707 : 320-323
- 97.- Aubert, I., Cecyre, D., Gauthier, S., Quirion, R. (1996). Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 369 (1) : 31-55.

- 98.-Gould, E., Woolf, N. J., Butcher, L.L (1991). Postnatal development of cholinergic neurons in the rat. **Brain Res. Bull.** 27 : 767-789.
- 99.- Brady, R. D., Phelps, E.P., y Vaughn, E. J. (1989) Neurogenesis of basal forebrain cholinergic neurons in rat. **Dev. Brain. Res.** 47 : 81-92.
- 100.- Represa ,A., Chanez, C., Flexor, M.A., y Ben-ari, Y. (1989). Development of the cholinergic system in control and intra-uterine growth retarded rat brain. Developmental. **Brain Res.** 47 : 71-79.
- 101.- Eckert, C.D., Barnes, R.H., y Levitskey, A.(1976). Regional changes in rat brain choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activity resulting from undernutrition imposed during different periods of development. **J. Neurochem.** 27 : 277-283.
- 102.- Ishii, K., Oda, Y ., Ichikawa, T., Deuchi, T. (1990). Complementary DNAs for Choline acetyltransferase from spinal cords of rat and mouse. Nucleotide sequences, expression in mammalian cells, and in situ hybridization. **Mol. Brain Res.** 7 : 151-159
- 103.- Viana. G.S.B., Figueiredo, R.M.O., Bruno, J.A. (1997) Effects of protein-energy malnutrition on muscarinic receptor density and acetylcholinesterase activity in rat brain. **Ann. Nutr. Metab.** 41 : 52-59.
- 104.- De Vries, T.J., Mulder, A.H., Schoffelmeer, A.N.M. (1992) Differential ontogeny of functional dopamine and muscarinic receptors mediating presynaptic inhibition of neurotransmitter release and postsynaptic regulation of adenylate cyclase activity in rat striatum. **Dev. Brain Res.** 66 : 91-96.
- 105.- Blatt, G.J., Rosene, D.L., Johnson, E., Galler, J.R.(1993). Prenatal protein malnutrition effects on the chemical neuroanatomy of the rat hippocampal formation. **Anat. Rec. Suppl.** 1 : 38- 43.

106.- Blatt, G.J., Rosene, D.L., Rhodes, K. J., Virga, A. (1991). Prenatal protein malnutrition effects on the cholinergic system of the rat hippocampal formation. **Soc. Neurosci. Abstr.** 17 : 663-670