

Tesis de Posgrado

Vías colinérgicas en el sistema nervioso central : Desarrollo y localización de receptores colinérgicos muscarínicos y actividad de acetilcolinesterasa

Jerusalinsky, Diana Alicia

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Jerusalinsky, Diana Alicia. (1986). Vías colinérgicas en el sistema nervioso central : Desarrollo y localización de receptores colinérgicos muscarínicos y actividad de acetilcolinesterasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2021_Jerusalinsky.pdf

Cita tipo Chicago:

Jerusalinsky, Diana Alicia. "Vías colinérgicas en el sistema nervioso central : Desarrollo y localización de receptores colinérgicos muscarínicos y actividad de acetilcolinesterasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2021_Jerusalinsky.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

U N I V E R S I D A D D E B U E N O S A I R E S

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

VIAS COLINERGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL :
DESARROLLO Y LOCALIZACION DE RECEPTORES COLINERGICOS MUSCA-
RINICOS Y ACTIVIDAD DE ACETILCOLINESTERASA.

AUTOR : Licenciada Diana Alicia Jerusalinsky.

DIRECTOR : Doctor Eduardo De Robertis

LUGAR DE TRABAJO : Instituto de Biología Celular, Facultad
de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

A Ñ O 1 9 8 6

- 2021 -
y.2

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

Agradecimientos.

Dedicatoria.

<u>CAPITULO I : INTRODUCCION.</u>	1
1. ESTADO ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE EL SISTEMA COLINERGICO CENTRAL.	2
1.1. <u>Acetilcolina como neurotransmisor y enzimas relacionadas.</u>	2
1.2. <u>Receptores.</u>	3
1.2.1. Receptores pre- y postsinápticos.	5
1.3. <u>Vías colinérgicas en el SNC.</u>	6
1.4. <u>Sistema visual.</u>	10
1.5. <u>Algunas consideraciones sobre las funciones del sistema colinérgico.</u>	11
1.6. <u>Algunas consideraciones sobre la neuropato- logía del sistema colinérgico central.</u>	14
2. ASPECTOS GENERALES Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS.	15
2.1. <u>Generalidades sobre los objetivos.</u>	15
2.2. <u>Desarrollo ontogenético de los receptores colinérgicos muscarínicos y de la activi- dad de acetilcolinesterasa.</u>	17
2.3. <u>Influencia de la deprivación visual sobre los receptores colinérgicos muscarínicos (RChM) y la actividad de acetilcolinesterasa (AChE).</u>	19
2.4. <u>Localización de RChM y AChE en el hipocampo.</u>	21
2.5. <u>Aferencias colinérgicas al neocortex. Loca-</u>	

lización de RChM y actividad de AChE.

- 2.6. Efectos del estrés sobre algunos parámetros colinérgicos en el SNC.

CAPITULO II : MATERIALES Y METODOS.

1. MATERIALES Y METODOS GENERALES.

- 1.1. Obtención del material biológico.
1.2. Fraccionamiento.
1.3. Determinación del contenido proteico.
1.4. Fijación específica de [³H]-QNB.
1.5. Determinación de la actividad de AChE.

2. METODOS ESPECIALES.

- 2.1. Desarrollo ontogenético de los RChM y de la actividad de AChE.
2.1.1. Animales de experimentación.
2.1.2. Aislamiento de las distintas áreas cerebrales.
2.1.3. Muestras para los ensayos de fijación de [³H]-QNB y para la determinación de AChE.
2.2. Influencia de la deprivación visual sobre los RChM y la actividad de AChE.
2.2.1. Animales de experimentación.
2.2.2. Areas cerebrales y tiempos seleccionados para realizar los ensayos.
2.2.3. Ensayos de fijación de [³H]-QNB y determinación de la actividad de AChE. Análisis de los resultados.
2.3. Localización de RChM y AChE en el hipocampo.
2.3.1. Animales de experimentación. Lesiones en el SNC.

	Página.
2.3.2. Muestras para ensayar fijación de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ y actividad de AChE. Análisis de los resultados.	40
2.4. <u>Localización de RChM y actividad de AChE en el neocortex.</u>	41
2.4.1. Animales de experimentación. Lesiones del nBM.	41
2.4.2. Muestras para ensayar la fijación de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ y la actividad de AChE. Tiempos estudiados.	42
2.4.3. Análisis de los resultados.	42
2.5. <u>Efectos del estrés agudo sobre los RChM del SNC.</u>	42
2.5.1. Animales de experimentación. Tratamiento.	42
2.5.2. Areas cerebrales y tiempos seleccionados para realizar los ensayos de fijación de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$.	43
<u>CAPITULO III : RESULTADOS Y DISCUSION PARCIAL.</u>	44
1. RESULTADOS GENERALES PARA LOS EXPERIMENTOS DE FIJACION DE $[^3\text{H}]\text{-QNB}$.	45
1.1. <u>Consideraciones generales sobre las características de la fijación del antagonista radioactivo.</u>	45
2. RESULTADOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE EXPERIMENTOS.	49
2.1. <u>Desarrollo ontogenético de los RChM y de la actividad de AChE.</u>	49
2.1.1. Contenido de proteínas en las diferentes regiones cerebrales, durante el desarrollo.	49

	Página.
2.1.2. Fijación de $[^3\text{H}]$ -QNB y actividad de AChE.	52
2.1.3. Discusión sobre los resultados obtenidos en los estudios sobre el desarrollo ontogenético de los RChM y de la actividad de AChE.	62
2.2. <u>Influencia de la privación visual sobre los RChM y la actividad de AChE.</u>	64
2.2.1. Fijación de $[^3\text{H}]$ -QNB en membranas de lóbulos ópticos de pollo.	64
2.2.2. Actividad de AChE en membranas de lóbulos ópticos de pollo.	69
2.2.3. Discusión de los resultados obtenidos en los estudios sobre privación visual.	69
2.3. <u>Localización de RChM y actividad de AChE en el hipocampo de la rata.</u>	73
2.3.1. Histología de la formación hipocámpica de ratas inyectadas intraventricularmente con AK.	74
2.3.2. Fijación de $[^3\text{H}]$ -QNB y actividad de AChE en membranas de hipocampos de ratas inyectadas con AK.	76
2.3.3. Fijación específica de $[^3\text{H}]$ -QNB y actividad de AChE en membranas de hipocampos de ratas inyectadas con AK y con posterior sección de la fimbria-fornix.	78
2.3.4. Discusión de los resultados obtenidos acerca de la localización de los RChM y de la actividad de AChE en el hipocampo.	82
2.4. <u>Localización de RChM y actividad de AChE en el neocortex.</u>	85

2.4.1. Extensión de las lesiones electrolíticas del nBM.	87
2.4.2. Fijación específica de $[^3\text{H}]$ -QNB en la corteza cerebral de ratas con lesión del nBM.	87
2.4.3. Actividad de AChE en corteza cerebral de ratas con lesión del nBM.	88
2.4.4. Discusión de los resultados obtenidos acerca de la localización de los RChM y de la actividad de AChE en la corteza cerebral.	88
2.5. <u>Efectos de una condición estresante sobre los RChM en distintas regiones del SNC.</u>	93
2.5.1. Fijación de $[^3\text{H}]$ -QNB en membranas de corteza cerebral, ganglios basales y cerebelo de ratas sometidas a natación forzada en agua a 18°C.	94
2.5.2. Discusión de los resultados obtenidos acerca de los efectos de una condición estresante sobre los RChM en distintas regiones del SNC.	100
<u>CAPITULO IV : DISCUSION FINAL Y CONCLUSIONES.</u>	104
1. DISCUSION Y CONCLUSIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE EXPERIMENTOS.	105
1.1. <u>Desarrollo ontogenético de los RChM y de la actividad de AChE en el SNC del pollo.</u>	105
1.2. <u>Influencia de la deprivación visual sobre los RChM y la actividad de AChE en los lóbulos ópticos del pollo.</u>	106
1.2.1. Conclusiones acerca del desarrollo de los RChM y de la actividad de AChE en el SNC de pollo; influencia de la deprivación visual en los LO.	109

	Página
1.3. <u>Localización de RChM y actividad de AChE</u> <u>en el hipocampo de la rata.</u>	112
1.3.1. Conclusiones acerca de la localización de los RChM y de la AChE en el hipocampo.	114
1.4. <u>Localización de RChM y actividad de AChE</u> <u>en el neocortex de la rata.</u>	115
1.4.1. Conclusiones acerca de la localización de los RChM y de la actividad de AChE en el neocortex.	117
1.5. <u>Efectos de una condición estresante sobre</u> <u>los RChM en distintas regiones del SNC.</u>	118
2. CONCLUSIONES GENERALES FINALES.	122
V. <u>BIBLIOGRAFIA.</u>	125
<u>ABREVIATURAS.</u>	142

Quiero expresar mi profundo agradecimiento:

Al Doctor Eduardo De Robertis por haberme dirigido en este trabajo de Tesis, por haberme integrado a su equipo brindándome todo su apoyo y por seguir siendo mi Maestro en la tarea de investigación científica.

Al Doctor Enrique T. Segura por haber guiado cálida y firmemente mis primeros pasos en el camino de la investigación científica.

Al Doctor José L. La Torre por haber dirigido mis primeras incursiones en el terreno de la bioquímica, brindándome sus conocimientos.

Al Doctor José S. O. Aguilar por haberme iniciado en el estudio bioquímico de los receptores colinérgicos muscarínicos, por brindarme su compañerismo y por colaborar en parte de los trabajos experimentales que constituyen esta Tesis.

Al Doctor Jorge H. Medina por haberme guiado en los aspectos neuroanatómicos, colaborando en la realización de lesiones y disecciones, así como por brindarme su amistad.

A la Doctora Claudia Wolfman por su colaboración en la corrección del manuscrito y en la confección de algunas figuras, así como por brindarme su cálida amistad.

A la Licenciada Sonia Raskovsky por haber colaborado en los experimentos preliminares que constituyen la prosecución del camino iniciado, por su entusiasmo y por su apreciada amistad.

A todo el equipo de trabajo del Dr Eduardo De Robertis, por su compañerismo cotidiano.

Quiero agradecer también a todos los miembros del Instituto de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, que de un modo u otro hicieron posible la concreción de estos trabajos.

A mis padres,
que me han alentado siempre con su afecto incondicional.

A mi hija,
que con su amor y su asombrosa curiosidad me estimula a
seguir adelante en esta búsqueda.

CAPITULO I.

INTRODUCCION

FE DE ERRATAS

Página	Línea	Donde dice	Debe decir
65	11	(tabla 3)	(figura 11)
	17	(tabla 3)	(figura 11)
66	ordenadas	(pm/l.o.)	(pm/mg de proteína)
		1 - 2 - 3 - 4	.1 - .2 - .3 - .4
	7	$[^3\text{H}]$ -QNB unido.	$[^3\text{H}]$ -QNB unido por mg de proteína.
68	1 del texto	pmoles/minuto por mg de proteína.	micromoles/minuto por mg de proteína.
94	5	RChM la corteza	RChM: la corteza
102	18	onservaron	observaron
111	4	desarr llo	desarrollo

1. ESTADO ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE EL SISTEMA COLINERGICO CENTRAL.

1.1. Acetilcolina como neurotransmisor y enzimas relacionadas.

Desde hace más de sesenta años es sabido que la acetilcolina (ACh) está presente en el cerebro de los Vertebrados (Dale, 1915), pero la inestabilidad tisular de esta molécula ha dificultado su demostración como neurotransmisor central, así como su localización precisa.

A fines de la década de 1960 y comienzos de la de 1970, las investigaciones sobre el sistema colinérgico recibieron un gran impulso gracias al desarrollo de métodos químicos para la determinación de ACh (Hanin, 1974), de métodos de fraccionamiento subcelular del tejido nervioso y de técnicas de microscopía electrónica para la visualización de componentes sinápticos, lo que permitió la demostración de la ACh como neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC) (De Robertis y Rodríguez de Lores Arnaiz, 1969; Kuhar y col., 1973; Kuhar, 1976; Barker, 1976).

Simultáneamente se han desarrollado técnicas histoquímicas para detectar la enzima de degradación de la ACh, la acetilcolinesterasa (AChE), lo que permitió obtener información acerca del curso que siguen los axones que contienen dicha enzima (Shute y Lewis, 1965; Shute, 1970). Sin embargo, la AChE ha sido cuestionada como marcador específico de la neurona colinérgica, porque se encuentra también en otras neuronas, aunque en menores concentraciones; a pesar de ello, Lehmann y Fibiger, (1979) han demostrado que existe un paralelismo entre la actividad de AChE y el neurotransmisor ACh.

Aunque la enzima de síntesis de la ACh, la colinacetilasa (ChAT) es un marcador más adecuado para los pericariones de neuronas colinérgicas, durante mucho tiempo sólo podía estudiarse bioquímicamente en homogenatos de tejido. Recientemente se han desarrollado técnicas inmunohistoquímicas para localizarla (McGeer y col., 1974, 1979). Pero hubo serias divergencias en cuanto a la pureza de los anticuerpos utilizados y los resultados fueron muy controvertidos (Rossier, 1976, 1981). Los últimos trabajos sobre la localización de neuronas colinérgicas en el SNC de la rata, realizados con estas técnicas perfeccionadas, arrojaron resultados muy semejantes, sino idénticos a los obtenidos por métodos fármaco-histoquímicos para AChE (Lehmann y col., 1979, 1980; Kimura y col., 1980, 1981).

1.2. Receptores.

Una vez liberada desde el terminal axónico, la sustancia neurotransmisora interactúa con un componente específico de la membrana postsináptica llamado receptor. Dicha interacción desencadena una serie de eventos que culminan con una respuesta como la despolarización de la neurona postsináptica, la contracción o relajación de un músculo, una secreción glandular o la alteración de la actividad cardíaca.

Las drogas que producen una respuesta semejante a la provocada por el transmisor endógeno se denominan agonistas y muchas veces tienen como sitio de acción el mismo sitio receptor. Las drogas que previenen la acción de los agonistas actuando sobre los receptores específicos, son llamadas clásicamente antagonistas. Las características, localización y otros datos importantes de los receptores pueden deducir-

se de estudios realizados con dichas drogas.

Desde tiempo atrás se sabe que la ACh tiene dos tipos principales de acción que pueden reproducirse utilizando las drogas muscarina y nicotina. Ambos tipos de efectos pueden antagonizarse con drogas como la atropina (antagonista muscarínico) y el curare (antagonista nicotínico) respectivamente. Entonces se postuló que existen dos tipos de receptores para la ACh: los muscarínicos y los nicotínicos (Eldefrawi y Eldefrawi, 1977).

En la década de 1970 se desarrollaron métodos para el abordaje de los receptores centrales por medio de técnicas de unión específica de agonistas y antagonistas radioactivos, lo que constituye un aporte fundamental al estudio del SNC (Bennet, 1978).

Si bien se han puesto en evidencia tanto receptores centrales nicotínicos (Hunt y Schmidt, 1978; Segal y col., 1978) como muscarínicos (Yamamura y col., 1974; Yamamura y Snyder, 1974), se sabe que el efecto de la ACh en el SNC es predominantemente muscarínico (Krnjevic y Phillis, 1963). Con métodos farmacológicos y electrofisiológicos se ha podido demostrar que la ACh liberada produce una despolarización lenta y sostenida del elemento postsináptico, que es bloqueada por aplicación de atropina, lo que indica como altamente probable la interacción con receptores colinérgicos de tipo muscarínico (Krnjević, 1974; Bartfai y col., 1977). Por otra parte es importante tener en cuenta que la densidad de receptores muscarínicos centrales es mucho mayor, al menos un orden de magnitud, que la concentración de receptores nicotínicos (Salvaterra y Fodders, 1979).

1.2.1. Receptores pre- y postsinápticos.

Las técnicas de fraccionamiento subcelular del tejido nervioso, desarrolladas en la década del sesenta, han permitido obtener las membranas celulares correspondientes a la región sináptica (De Robertis y col., 1966). Es allí donde se encuentran concentrados los neuroreceptores que corresponderían a la membrana postsináptica y serían responsables de ligar al neurotransmisor en cuestión, provocando cambios en la permeabilidad de la membrana, seguidos de una serie de eventos encadenados que posibilitan la transmisión del impulso nervioso (Miledi y col., 1971).

En 1977, Langer sugirió la existencia de receptores localizados en la membrana presináptica, a los que se llamó "autorreceptores" o "receptores presinápticos", que estarían involucrados en la regulación de la liberación del neurotransmisor. Seguidamente se realizaron abundantes demostraciones de la existencia de receptores presinápticos adrenérgicos y de su intervención en la liberación de noradrenalina (Langer, 1980), aunque la mayoría de las evidencias se obtuvieron en sistema nervioso periférico. También se obtuvieron varias evidencias de la existencia de receptores presinápticos colinérgicos en el sistema nervioso periférico, tanto de tipo muscarínico (Kilbinger, 1977) como nicotínico (Miledi y col., 1978), aunque estos últimos no han podido ser detectados en los ganglios simpáticos. Simultáneamente, Hadházy y Szerb (1977) observaron que la liberación de ACh endógena desde cortes de hipocampo, corteza cerebral o estriado de rata, evocada por estimulación eléctrica o por alta concentración de K^+ , resultaba potenciada por el agregado de

atropina y disminuída por fisostigmina (anticolinesterásico), oxotremorina o carbamilcolina (agonistas muscarínicos). Entonces sugirieron que en el SNC existían receptores muscarínicos localizados en axones y terminales colinérgicos, cuyo rol fisiológico sería la autorregulación de la liberación de ACh. Pudo observarse un comportamiento similar en la liberación de ACh a partir de terminales nerviosos aislados de hipocampo de rata (Marchi y col., 1981). Es interesante notar que la potenciación causada por atropina ocurre en presencia y en ausencia de inhibidores de la AChE (Szerb, 1977). Estas evidencias farmacológicas indirectas de la posible existencia de receptores muscarínicos presinápticos no pudieron corroborarse directamente o mediante el empleo de lesiones definidas del SNC, si bien los efectos sobre la liberación de ACh, medidos en diversas condiciones fisiológicas y farmacológicas, arrojaron resultados que apoyan consistentemente dicha hipótesis (Szerb, 1980). La evidencia más directa se obtuvo utilizando un procedimiento basado en la disolución selectiva de la membrana presináptica, partiendo de una fracción de sinaptosomas, lo que ha permitido demostrar la presencia de receptores muscarínicos pre- y postsinápticos en la corteza cerebral de rata, mientras que los receptores nicotínicos resultaron de localización predominantemente postsináptica (De Robertis y col., 1967; Aguilar y col., 1979).

1.3. Vías colinérgicas en el SNC (fig. 1).

A pesar de los esfuerzos realizados para dilucidar la anatomía de las vías colinérgicas centrales, hasta hace cuatro o cinco años podía decirse que la vía septo-hipocámpica,

que proyecta desde el núcleo septal medial (nSM) a la formación hipocámpica (FH), era el único tracto en el cerebro, identificado como colinérgico sin lugar a dudas. La tremenda dificultad que significa la carencia de técnicas específicas para identificar neuronas colinérgicas, se ve claramente reflejada en este hecho. Afortunadamente, el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas para el estudio de AChE, ChAT y receptores colinérgicos, revirtió drásticamente la situación (ver 1.1., pág.3).

Ahora se tiene un concepto algo más preciso sobre la anatomía del sistema colinérgico. Se ha confirmado la existencia de las vías colinérgicas ascendentes por el tracto tegmental dorsal, propuestas por Shute y Lewis en 1967, mientras que se ha descartado prácticamente la participación del tracto tegmental ventral y la proyección habénulo-interpeduncular en dicho sistema (Fibiger, 1982).

El "striatum" o estriado, correspondiente a núcleo caudado y putamen, y el núcleo accumbens son los únicos del cerebro que poseen neuronas colinérgicas intrínsecas claramente diagnosticadas. El estriado posee valores elevados de todos los parámetros colinérgicos mencionados, con excepción de los receptores nicotínicos (Hunt y Schmidt, 1978) y es la región con mayor concentración de receptores muscarínicos (Rotter y col., 1979).

Además de las neuronas colinérgicas de proyección que se encuentran en el tallo cerebral, especialmente en el núcleo cuneiforme y en el núcleo tegmental látero-dorsal, que inervan el diencéfalo, el resto de los pericariones colinérgicos se hallan ubicados en la región basal del cerebro an-

terior, ampliamente distribuidos en sentido ántero-posterior al menos en la rata y en el gato y algo más delimitados en los primates. Parece ser un número relativamente pequeño de células que constituyen la fuente de todas las proyecciones colinérgicas en dicha región.

Con las técnicas más perfeccionadas, no se han encontrado neuronas colinérgicas en el neocortex (Lehmann y col., 1980; Kimura y col., 1980), en los bulbos olfatorios (Kimura y col., 1981), en el hipocampo (Fonnum y Walaas, 1978; Schwarcz y col., 1978), en la amígdala, en el tálamo y en el tectum (Kimura y col., 1980, 1981). Con excepción de los cuerpos neuronales supuestamente colinérgicos del hipotálamo lateral y dorsal, hay buenas evidencias de la naturaleza colinérgica de las demás neuronas postuladas. En la rata tienen una muy amplia distribución rostro-caudal, en una cadena casi continua que va desde los tubérculos olfatorios hasta el nivel de los núcleos subtalámicos, y cuya división resulta un tanto arbitraria ya que no posee límites definidos.

En forma sintética estas proyecciones van desde:

- 1) rama horizontal de la banda diagonal de Broca (BD) y núcleo preóptico magnocelular (nPM) a los bulbos olfatorios,
- 2) septum medial (SM) y rama vertical de la BD al hipocampo,
- 3) núcleo basal magnocelular (nBM) principalmente y rama horizontal de la BD y nPM, secundariamente, al neocortex,
- 4) rama horizontal de la BD y nPM a la amígdala,
- 5) rama horizontal de la BD, nPM e hipotálamo lateral al área tegmental ventral y a los núcleos de la Mábénula (Herkenham y Nauta, 1977; Phillipson, 1979).

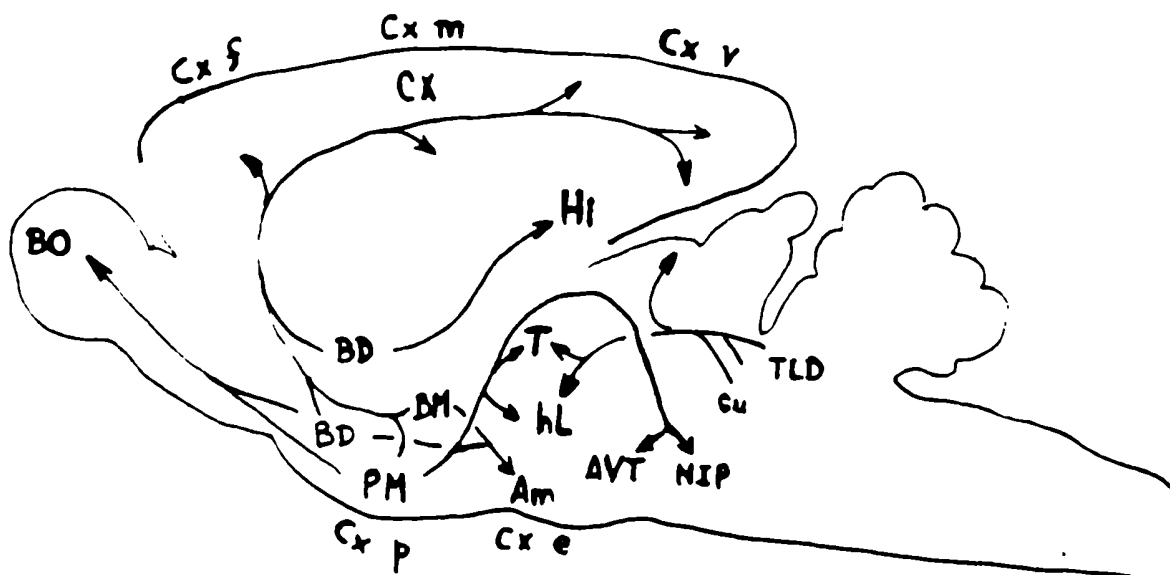


Figura 1: Esquema de una vista sagital de las vías colinérgicas ascendentes y descendentes.

Am: amígdala; AVT: área ventral tegmental; BD: ramas de la banda diagonal; BM: núcleo basal magnocelular; BO: bulbo olfatorio; Cu: núcleo cuneiforme; Cx: neocortex; Cx e: corteza entorrinal; Cx f: corteza frontal; Cx m: corteza motora; Cx p: corteza piriforme; Cx v: corteza visual; Hi: hipocampo; hL: hipotálamo lateral; NIP: núcleo interpeduncular; PM: núcleo preóptico magnocelular; T: tálamo; TLD: núcleo tegmental látero-dorsal.

Si bien las proyecciones conservan una cierta topografía ántero-posterior en el sentido de que las neuronas que proyectan a los bulbos olfatorios y a la formación hipocámpica (FH) parecen ser anteriores a las que van al neocortex y a la amígdala, existe cierto grado de superposición; además es posible que algunas neuronas posean axones bifurcados, con ramas ascendentes y descendentes, en la BD y en el nPM (Divac, 1975), que envíen aferencias a corteza y al tallo cerebral respectivamente (Millhouse, 1969).

1.4. Sistema visual

El sistema visual merece ser considerado separadamente debido a las persistentes discrepancias sobre el rol de la ACh como neurotransmisor en estas vías.

Algunos trabajos realizados en ratas y en gatos, descartarían la existencia de neuronas colinérgicas en colículo superior, cuerpo geniculado lateral y corteza visual (Kimura y col., 1981). Tanto el cuerpo geniculado lateral como los colículos superiores poseen una baja concentración de receptores colinérgicos muscarínicos (RChM); la principal fuente de aferencias colinérgicas parece ser el núcleo cuneiforme, que se proyecta bilateralmente sobre los cuerpos geniculados laterales, a través del tracto tegmental dorsal (Hoover y Jacobowitz, 1979). En cambio en la lámina superficial de los colículos superiores existe una alta concentración de receptores nicotínicos (Hunt y Schmidt, 1978; Segal y col., 1978). Se desconoce su significado así como la existencia de una vía colinérgica aferente. Tal vez, dichos receptores estén asociados, al menos en parte, con terminales

nerviosos retino-coliculares (Francis y Schechter, 1980); aunque en la rata el nervio óptico parece tener muy poca actividad tanto de ChAT como de AChE (Bigl y Schober, 1977).

La corteza visual, igual que el resto del neocortex, recibe su inervación colinérgica del nBM y de la BD.

Aun cuando los resultados obtenidos en la rata y en el gato parecieran indicar que las conexiones entre la retina, los cuerpos geniculados laterales, los colículos superiores y la corteza visual, no serían colinérgicas, en 1979 Oswald y col. enunciaron la posibilidad de que la ACh fuera un neurotransmisor en la proyección retino-tectal de ciertos Vertebrados inferiores como *Bufo marinus*, a partir de sus experimentos de enucleación, que produjeron disminución de la concentración de ACh y de la actividad de AChE en el "tectum opticus". Posteriormente observaron un fenómeno semejante en *Carassius* (Oswald y Freeman, 1980).

1.5. Algunas consideraciones sobre las funciones del sistema colinérgico.

Corresponde señalar aquí que es muy poco lo que se conoce acerca de las funciones de las proyecciones colinérgicas en el cerebro. Hay razones poderosas para ello: fundamentalmente la carencia de un conocimiento preciso de la anatomía del sistema, a lo que se agrega la extensa distribución, sin límites definidos, de las neuronas colinérgicas intercaladas con otras que no lo son, enviando colaterales a regiones muy diversas del cerebro (Millhouse, 1969; Fibiger, 1982).

Sin embargo, existen algunos datos orientadores; en base a estudios morfológicos se ha propuesto que las neuronas

intersticiales del nBM, representan la extensión anterior de la formación reticular (FR). A pesar de que los terminales corticales no se originan en el mesencéfalo, dichas neuronas podrían estar involucradas en el sistema de alerta reticular ascendente, por medio de interconexiones polisinápticas (Lehmann y col., 1980).

Diversos estímulos periféricos, así como la estimulación de la FR mesencefálica, aumentan la liberación de ACh desde la corteza (Phillis, 1968; Pepeu, 1973). Los estimulantes de la psicomotricidad también aumentan la liberación de ACh, mientras que las drogas depresoras a nivel central, tienden a disminuir la liberación de ACh cortical (Pepeu, 1973).

Aunque durante mucho tiempo se creyó que el ritmo de liberación de ACh desde la corteza era proporcional al grado de desincronización del EEG, que se correlaciona con el estado comportamental de alerta, existen numerosos ejemplos en los que ha podido disociarse la liberación de ACh, tanto de la desincronización electroencefalográfica como de la activación comportamental (Pepeu, 1973).

Como existe una gran diversidad de estímulos que aumentan la liberación de ACh cortical, como el despertar por ruido, la estimulación eléctrica de la FR o las drogas convulsivantes y no hay una clara correlación con hechos fisiológicos, el significado funcional permanece desconocido.

Hay otra importante línea de trabajos que involucran al sistema colinérgico en los procesos de memoria y comportamiento. Las drogas que afectan la actividad colinérgica, como por ejemplo los anticolinesterásicos, que han merecido

especial atención por su acción tóxica, tienen notables efectos sobre el comportamiento, ya que producen estados de confusión y desorientación, signos de depresión y ansiedad y serias dificultades en la concentración y en el razonamiento en los seres humanos (Squire y Davis, 1981; Russell, 1982).

Por otra parte, se sabe que drogas que bloquean los RChM alteran las funciones cognoscitivas superiores e inducen estados transitorios de amnesia (Longo, 1966); dicho estado, producido por antagonistas muscarínicos como la escopolamina, parece tener gran semejanza con la amnesia que sufren los individuos al envejecer (Drachman y Leavitt, 1974). Aunque hay numerosas evidencias de que las drogas que afectan la transmisión colinérgica tienen alguna acción sobre el aprendizaje y la memoria, este efecto varía enormemente según la vía de administración, la dosis empleada, el ensayo comportamental elegido, la especie y aun la cepa de animales empleados (Karczmar y col., 1973; Karczmar, 1976). Más aún, el efecto también depende del momento de administración de la droga en relación a la prueba de aprendizaje; si se administra oxotremorina (agonista muscarínico) antes de una sesión de adquisición de una respuesta de evitamiento pasivo, produce disminución de la performance durante el posterior ensayo de retención; en cambio, si se administra oxotremorina o eserina (anticolinesterásico) luego de la sesión de adquisición, facilitan la retención en forma dosis-dependiente. En ambos casos el efecto es antagonizado por atropina y no por antagonistas nicotínicos (Baratti, 1982).

Como los efectos antes mencionados sobre la liberación de ACh también son bloqueados por atropina, pero no se afec-

tan por antagonistas nicotínicos, se piensa que son mediados por mecanismos muscarínicos excitatorios. Sin embargo, aunque la atropina puede producir un EEG característico del sueño, el estado comportamental puede ser de alerta, por lo que resulta lógico suponer que las vías colinérgicas no serían las únicas involucradas (Karczmar y Dun, 1982).

En 1974, Myers puso de relieve: "...lo impactante que resulta el hecho de que la ACh sea la única sustancia que puede influir cada respuesta comportamental o fisiológica, examinada hasta el momento".

Anisman (1978), en su exhaustiva revisión sobre los cambios neuroquímicos producidos por "stress", menciona algunos trabajos que involucran al sistema colinérgico central. En síntesis, se han demostrado niveles aumentados de ACh cerebral, en condiciones severas de "stress".

En 1982, Fibiger concluyó: "...si bien existen razones para considerar a las neuronas colinérgicas de la base del cerebro, como la extensión rostral de la FR, hay un enorme espacio en blanco en nuestro conocimiento del papel que desempeñan estas neuronas en el comportamiento".

1.6. Algunas consideraciones sobre la neuropatología del sistema colinérgico central.

Las vías colinérgicas del cerebro han adquirido importancia en neuropatología, desde que se descubrió que los pacientes con enfermedad de Huntington (CH) presentaban una disminución de los marcadores colinérgicos en el cuerpo estriado y que los pacientes con demencia presenil o senil de

tipo Alzheimer (DSTA) , tenían disminuídos dichos marcadores en la corteza cerebral (Bowen y col., 1976; Spillane y col., 1977; Davies, 1979). Pudo observarse que estos hechos se correlacionan con la pérdida de neuronas colinérgicas en el estriado, en la CH y que, una condición neuropatológica que puede ser crítica para la DSTA es la pérdida de neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert (correspondiente al nBM), en la BD y en la región septal medial (Whitehouse y col., 1982; Perry y Perry, 1982; Coyle y col., 1983).

Sin embargo se desconocen cuáles síntomas de las enfermedades están asociados con la actividad colinérgica afectada.

2. ASPECTOS GENERALES Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

2.1. Generalidades sobre los objetivos.

En base a las consideraciones y antecedentes mencionados, este trabajo de tesis se ha centrado en el estudio de la localización de los receptores colinérgicos muscarínicos y de la actividad de acetilcolinesterasa en el SNC, en áreas de particular interés por estar supuestamente involucradas en vías colinérgicas principales o en regiones que, si bien no poseen neuronas o aferencias colinérgicas demostradas, tienen una actividad de las enzimas relacionadas y una concentración de RChM considerable.

Se ha encarado el estudio del desarrollo de los RChM y de la actividad de AChE en una especie de Aves, teniendo en cuenta los antecedentes de trabajos en diferentes especies. Además de aportar nuevos datos sobre la ontogénesis

del sistema colinérgico, se eligió el pollo como animal de experimentación con el objetivo de analizar la posible intervención de dicho sistema en las vías visuales que, en particular en las Aves, alcanzan un gran desarrollo.

Se ha puesto especial énfasis en tratar de esclarecer la localización de los RChM y de la actividad de AChE, en relación con las sinapsis, en vías colinérgicas importantes como la septo-hipocámpica y en las aferencias al neocortex.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados en 1.5, en este mismo capítulo, acerca de las funciones del sistema colinérgico central y con el objetivo de tratar de poner en evidencia la posible regulación de los RChM en condiciones fisiológicas, se eligió como diseño experimental para producir un "stress" agudo, la natación forzada, situación que resulta ineludible para la rata.

Este enfoque apunta a contribuir al esclarecimiento de la localización de receptores de tipo muscarínico, que median la transmisión colinérgica en ciertas regiones, corroborando o sugiriendo vías probables y aportando datos e ideas sobre la posible regulación de dichos RChM, a través de diseños experimentales, donde se combinan diferentes técnicas.

Uno de los aspectos en que se ha puesto especial atención es el curso temporal de los estudios realizados, con el objetivo de poder observar probables cambios en los parámetros considerados, teniendo especialmente en cuenta que hasta el presente, no hay antecedentes de variaciones rápidas en el nivel de los RChM centrales.

2.2. Desarrollo ontogenético de los receptores colinérgicos muscarínicos y de la actividad de acetilcolinesterasa.

La introducción del benzilato de quinuclidina tritiado (^3H -QNB), un potente antagonista muscarínico, altamente específico, ha hecho posible el estudio de los RChM en varias áreas del SNC (Yamamura y Snyder, 1974a) permitiendo el seguimiento del desarrollo ontogenético en la rata (Coyle y Yamamura, 1976) y en el conejo (Yavin y Harel, 1979). En estas especies, los niveles postnatales de sitios muscarínicos específicos fueron investigados en varias regiones del SNC. En la rata se observó que se desarrollan a diferentes velocidades, más rápidamente en la médula y más lentamente en el diencéfalo y la corteza cerebral (Kuhar y col., 1980).

El embrión de pollo ofrece numerosas ventajas para los estudios ontogenéticos de este tipo. Ya en el momento de la eclosión muchos de los parámetros funcionales han alcanzado un alto grado de desarrollo (Peters y col., 1956). Entre el séptimo y el tercer día previos al nacimiento aumenta notablemente la concentración de proteínas en el cerebro, aparecen gran número de sinapsis junto con el desarrollo de actividad eléctrica, coordinación motora y respuesta a diferentes drogas (Oppenheim y Foelix, 1972).

Hay evidencias de un crecimiento rápido en el número total de receptores colinérgicos nicotínicos, medidos por fijación de α -bungarotoxina (α -BuTx) en cerebro total, en los días 17 y 18 del desarrollo embrionario, alcanzando un máximo en el nacimiento, habiendo luego una pérdida de receptores que se sugirió que podría coincidir con la maduración

de las sinapsis (Wang y Schmidt, 1976).

En 1976, Enna y col. aportaron algunos datos interesantes sobre el desarrollo de los receptores muscarínicos en el cerebro del pollo; pero como los ensayos se hicieron en homogenatos totales, no se podían apreciar las diferencias regionales. Encontraron una fijación específica con alta afinidad para $[^3\text{H}]\text{-QNB}$, ya que la constante de disociación aparente (K_D) fue de 0.2 nM; el número máximo de sitios de unión ($B_{\text{máx}}$) incrementó rápidamente luego del día -9 (nueve días antes del nacimiento), aumentando cinco veces su valor entre los días -7 y -3, coincidiendo con el aumento de proteínas y la aparición de sinapsis con actividad eléctrica antes mencionadas (Oppenheim y Foelix, 1972).

Como la maduración de las distintas regiones del cerebro presenta características diferentes, se decidió estudiar la ontogénesis de los receptores muscarínicos en porciones definidas del SNC del pollo.

Si bien la AChE no es un marcador definitorio para la identificación de la neurona colinérgica, como se mencionó en este mismo capítulo (1.1) existe cierto paralelismo entre la actividad de la enzima y el neurotransmisor (Lehmann y Fibiger, 1979). Por otra parte se sabe que la actividad de AChE varía durante el desarrollo del sistema nervioso (Elkes y Todrick, 1955; Krnjevic y Silver, 1966; Gómez y col., 1970; Enna y col., 1976). En base a estos antecedentes se hizo el seguimiento de la actividad de esta enzima como otro parámetro para estudiar la ontogénesis del sistema colinérgico.

2.3. Influencia de la privación visual sobre los receptores colinérgicos muscarínicos y la actividad de AChE.

El pollo ofrece un modelo muy adecuado para los estudios relacionados con las vías visuales, ya que la mayor parte de las fibras del nervio óptico conectan únicamente con el lóbulo óptico contralateral (Cowan y col., 1961; Kelly y Cowan, 1972), pudiendo así disponerse de un control interno en el mismo animal.

En 1969, Marchisio observó que la remoción de la copa óptica del embrión de pollo, produjo una caída de la actividad de ChAT en los lóbulos ópticos, que se incrementó en la medida en que las operaciones se efectuaban más tardíamente; en cambio en los pollos jóvenes la enucleación produjo cambios muy lentos, que se ponían en evidencia recién a los dos meses; por lo que postuló que, al menos en dicha etapa, la ChAT era independiente de las sinapsis en cuestión.

Rose y Stewart (1978), trabajando con ratas criadas en la oscuridad, no encontraron diferencias significativas en la unión específica de QNB a la corteza visual, con respecto a ratas que vivieron con períodos alternados de doce horas de luz y doce de oscuridad. Pero sí observaron un incremento del 45 % en la fijación de QNB, cuando expusieron a la luz por tres horas a estos animales privados, respecto a controles mantenidos en oscuridad permanente.

Trabajando con pollitos neonatos, Francis y col. (1980) no detectaron cambios en los receptores muscarínicos de los lóbulos ópticos, luego de deaferentación de la vía retinotectal, a los dos, cuatro y ocho días luego de la sección del nervio óptico, encontrando una pequeña caída significa-

tiva recién a los dieciocho días. Por otra parte, Brecha y col. (1979) habían detectado una disminución en la fijación de α -BuTx en los lóbulos ópticos deafferentados de neonatos y adultos, que fue significativa a los dos días de la sección del nervio; entonces consideraron a los receptores colinérgicos nicotínicos directamente involucrados en esta vía. Los niveles de AChE y de ChAT eran elevados y no se modificaron. Sin embargo, el máximo en la fijación específica de α -BuTx en el cerebro del pollo, se alcanza en el período embrionario, siendo siempre menor en el animal neonato, joven y adulto; en particular en los lóbulos ópticos, el máximo nivel parece estar entre los días 12° y 15° de incubación (Kouvelas y Greene, 1976). Por su parte, Wang y Schmidt (1976), teniendo en cuenta el número total de receptores nicotínicos, observaron un crecimiento rápido que comienza el día 17° a 18° del desarrollo embrionario y alcanza un máximo en el nacimiento, cayendo luego a los dos o tres días.

Las fibras retinianas comienzan a llegar al tectum el 6° día y continúan llegando hasta la última semana de la incubación. Pero la luz recién evoca potenciales en el tectum luego del día 18° del desarrollo (Sedláček, 1967; Blozowski y Blozowski, 1968).

Cuando se realizaron los experimentos en embriones de pollo para seguir el desarrollo de los receptores muscarínicos y de la actividad de AChE, pudo observarse un notable aumento en ambos parámetros desde el nacimiento hasta el día 12° de vida postnatal, en los lóbulos ópticos, comenzando el crecimiento del número de receptores tempranamente en el embrión, mientras que los niveles de AChE se mantienen bajos

por más tiempo. Recién dos días antes del nacimiento comienza un rápido aumento de la AChE en los lóbulos ópticos, que llegan a ser la región del cerebro con mayor actividad de la enzima en la eclosión (Jerusalinsky y col., 1981).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y los objetivos enunciados, se decidió analizar el efecto de la privación de estimulación visual en la fijación específica de $[^3\text{H}]$ -QNB y en la actividad de AChE en LO de pollitos neonatos.

2.4. Localización de RChM y AChE en el hipocampo.

Como se mencionó anteriormente (1.3), la proyección septo-hipocámpica constituye un sistema acerca del cual existe total acuerdo desde tiempo atrás, con respecto a su naturaleza colinérgica.

Ya en 1954, Daitz y Powell demostraron que luego de la lesión del hipocampo, las neuronas del núcleo septal medial (nSM) y las adyacentes neuronas de la rama vertical de la BD, sufren degeneración retrógrada.

Las neuronas histoquímicamente positivas para AChE en la región septal y las que se marcan luego de la inyección de peroxidasa de rábano (HRP) en el hipocampo, coinciden en gran medida en su distribución (Mesulam y col., 1977). Lewis y Shute (1967) observaron que existen grandes neuronas intensamente positivas para las pruebas histoquímicas de AChE en el nSM y en la BD, que proyectan vía la fimbria y el fórnix dorsal, al hipocampo (Shute y Lewis, 1967; Lewis y col., 1967). Los mismos autores observaron que, luego de seccionar la fimbria o lesionar el septum medial hay una pérdida significativa de la tinción para AChE en la formación hipocámpica.

Estas aferencias al hipocampo proyectan especialmente sobre las regiones piramidales CA3 y CA4 (Raisman, 1966; Mellgren y Srebro, 1973). Tanto el "stratum oriens", que contiene las dendritas basales de las células piramidales, como el "radiatum", que contiene las dendritas apicales, se tiñen intensamente para AChE (Shute y Lewis, 1967); pero la mayor concentración de terminales nerviosos se encuentra en el "stratum oriens" (Rose y col., 1976).

Fonnum (1970) estudió la localización subcelular y la topografía de la actividad de ChAT en la formación hipocámpica de la rata, comprobando que la mayor actividad se encuentra en una zona infrapiramidal estrecha y va disminuyendo con la distancia desde dicha región.

Yamamura y Snyder (1974, b) y Kuhar y Yamamura (1976), con métodos radioautográficos para localizar receptores muscarínicos, observaron una importante densidad en los "stratum oriens" y "radiatum", en las subregiones CA1, CA2, CA3 y CA4, pero particularmente en las tres últimas. También hay una densidad considerable de fijación de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en el giro dentado, especialmente en la capa molecular, donde se encuentran las dendritas de las células grano (Kuhar y Yamamura, 1976; Rotter y col., 1979).

En el "stratum oriens" y en la capa polimorfa, infragranular del giro dentado, hay una importante fijación de $\alpha\text{-BuTx}$ (Hunt y Schmidt, 1978, 1979; Polz-Tejera y col., 1975) posiblemente correspondiente a receptores nicotínicos localizados en interneuronas de esa región (Mosko y col., 1973).

La estratificación regular de la formación hipocámpica de la rata y los antecedentes bibliográficos expuestos sobre

sus aferencias colinérgicas, la convierten en una estructura muy adecuada para el estudio de la localización de los RChM. Se han realizado distintos trabajos interrumpiendo la vía colinérgica por lesión septal (Yamamura y Snyder, 1974, b; Overstreet y col., 1980) o por sección de la fimbria-fornix (Sábato y col., 1981); pero en ninguno de los casos se obtuvieron cambios en la fijación del antagonista muscarínico [^3H]-QNB. Estos resultados negativos llevaron a concluir que los RChM tienen una localización postsináptica.

Una característica especial de la formación hipocámpica de la rata, es su vulnerabilidad al efecto neurotóxico del ácido kaínico (AK), un agonista glutamatérgico que, probablemente, destruye las neuronas como consecuencia de una excitación persistente, semejante a un episodio de "status epilepticus" (Nadler y col., 1978).

La utilización del AK como neurotoxina se desarrolló en el intento de recrear un modelo experimental de la Corea de Huntington, efectuando inyecciones en el cuerpo estriado (Coyle y Schwarcz, 1976; McGeer y McGeer, 1976). Con la inyección de 1.25 nmoles de AK, a las pocas horas se produce la degeneración de los somas en el estriado, alcanzando las dendritas a las diez horas, los pequeños axones entre las veinticuatro y cuarenta y ocho horas y los botones sinápticos a las setenta y dos horas, permaneciendo en el mismo estado durante los cuarenta días que se prolongaron las observaciones. Con dosis mayores (2.5 nmoles) el proceso se acelera y hay más destrucción (Hattori y McGeer, 1977). Olney y de Gubareff (1978), lesionando el cuerpo estriado con AK

"in situ", observaron efectos dendrito-somatotóxicos semejantes a los del glutamato, pero mucho más potentes, ya que una inyección de 3.5 nmoles de AK en cerebro de rata destruye localmente gran parte de las neuronas; sin embargo no afecta los axones de paso, ni los terminales de ese lugar.

En su estudio detallado del efecto del AK sobre la formación hipocámpica (FH) de rata, Nadler y col. (1978) observaron que con dosis muy pequeñas, de 0.1 μ gr (0.5 nmoles), se afectan primero las neuronas piramidales de la subregión CA3 en el polo rostral y el efecto va disminuyendo desde la entrada de la fimbria hacia el giro dentado, desde CA3a hacia CA3c y CA4. Incrementando la dosis se dañan también las neuronas de CA4 y en general las zonas más posteriores; mientras que para afectar las de CA1 son necesarias dosis mayores. El glutamato no es efectivo para destruir neuronas piramidales aún en dosis que triplican las efectivas de AK. Por otro lado, las células grano son resistentes a esta neurotoxina, aún cuando el glutamato es el neurotransmisor más importante en la fascia dentada y las células son realmente despolarizadas por la aplicación iontoforética de glutamato. Luego de veinticuatro horas de la aplicación intraventricular de AK, pudo observarse la destrucción de los somas y de las dendritas; a los tres días ya se encontraban afectados numerosos axones y botones sinápticos. No se observaron daños en las fibras aferentes septo-hipocámpicas ni en las fibras musgosas, ya que los cuerpos de las células grano resultaron intactos (Nadler y col., 1978).

Las neuronas piramidales de CA3a particularmente, y de CA3 en general, parecen ser las más sensibles de todo el SNC

frente a episodios de anoxia o de epilepsia severa, siguiéndoles en sensibilidad las de CA2 y siendo mucho menos susceptibles las de CA4 (Nadler y col., 1980).

La administración sistémica o intra-amigdalina de AK, produce primero la correspondiente lesión "in situ" si es aplicada en tejido nervioso, y secundariamente provoca lesiones en la FH y en el tálamo medial, observándose siempre crisis convulsivas en los animales que resultan lesionados (Ben-Ari y col., 1979). Pareciera que la lesión secundaria no se debe a la difusión de la toxina sino al estado epiléptico que provoca, teniendo en cuenta que dicho estado se acompaña de alteraciones histológicas en la FH, en el complejo amigdalino y en el tálamo medial, tanto en el hombre como en los demás animales estudiados.

En cortes delgados de hipocampo se ha visto que las células piramidales de CA3 son las más sensibles a despolarización por aplicación de AK (Robinson y Deadwyler, 1981). Teniendo en cuenta esta vulnerabilidad diferencial de las neuronas hipocámpicas, se utilizó AK para profundizar en el estudio de la localización de los RChM, por fijación de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$.

2.5. Aferencias colinérgicas al neocortex. Localización de receptores colinérgicos muscarínicos y actividad de acetilcolinesterasa.

Desde hace más de veinte años se sabe que hay liberación de ACh desde la corteza cerebral, en condiciones fisiológicas y que tanto la ACh como drogas que alteran la neurotransmisión colinérgica, influyen en la actividad eléctrica

cortical. En base a estos hallazgos, en 1963, Michell sugirió la existencia de vías colinérgicas tálamo-corticales.

Con técnicas histoquímicas para AChE, Shute y Lewis (1967) concluyeron que la inervación colinérgica cortical proviene del tallo cerebral y del globo pálido; pero la existencia de AChE en neuronas no colinérgicas y esencialmente la falta de métodos más específicos, condujeron a que el mapeo de las vías colinérgicas centrales dependiera, primariamente, de los efectos de lesiones circunscriptas y sus consecuencias sobre los marcadores colinérgicos.

Aunque no se conoce una toxina que afecte específicamente a la neurona colinérgica, se han empleado diferentes neurotoxinas, entre las que el ácido kaínico (AK) ha resultado de gran utilidad, como ya se mencionó en 2.4 (Pág. 23).

Cuando se coloca AK en globo pálido dorsal, corteza piriforme, corteza entorrinal y tálamo, no se observan cambios en los marcadores colinérgicos en la corteza cerebral. Por lo tanto no existirían las vías tálamo-corticales de Michell ni las aferencias desde el globo pálido (GP), pero en cambio los marcadores colinérgicos descienden notablemente en el neocortex, cuando se inyecta AK en la región de las neuronas magnocelulares ventrales al GP (Johnston y col., 1979). Dicha caída no puede atribuirse a la lesión de terminales y degeneración retrógrada, porque no hay pérdida neuronal en la corteza. Las lesiones electrolíticas, que dañan las fibras de la cápsula interna, tampoco alteran las enzimas relacionadas.

Ya en 1966, Ramón-Moliner y Nauta decían: "En los hechos

morfológicos, las magnocelulares recuerdan las neuronas reticulares dispersas en el tallo cerebral, incluyendo neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas que dan una directa y amplia proyección hacia la corteza."

La inyección de HRP en el neocortex de la rata, marca las neuronas magnocelulares basales (Arikuni y Ban, 1978). Lehmann y col. (1980) produjeron degeneración retrógrada de dichas neuronas por ablación cortical, con caída de la actividad de ChAT y de AChE en la región del nBM.

La inyección intracortical de AK produjo destrucción masiva de los cuerpos neuronales, disminuyendo notablemente la actividad enzimática de glutámico-decarboxilasa; no así la actividad de ChAT ni de AChE, por lo que se concluyó que, o no existen o hay muy pocas neuronas colinérgicas en la corteza (Lehmann y col., 1980).

Las neuronas con moderada actividad de AChE del tálamo, parecen ser colinoceptivas (Hoover y Jacobowitz, 1979) y, en todo caso, no se han encontrado allí pericariones colinérgicos, como tampoco parecen encontrarse en el neocortex (Kimura y col., 1980)

En base a lesiones parciales del nBM de la rata, Wenk y col. (1980) postularon que dichas neuronas tienen una amplia distribución y proyectan hacia el neocortex con una topografía ántero-posterior; serían homólogas a las del núcleo basal de la "sustantia innominata" de los Primates.

El hecho de que las lesiones electrolíticas o con AK, efectuadas en la región de las magnocelulares, den una reducción de entre el 30 y el 80% en la actividad de AChE y

de ChAT en la hemicorteza ipsilateral, puede explicarse por la amplia distribución y la topografía particular de las neuronas en cuestión (Lehmann y col., 1980; Wenk y col., 1980).

En el neocortex existen receptores colinérgicos tanto nicotínicos como muscarínicos, pero como se mencionó anteriormente, estos últimos representan la mayoría de los receptores para ACh (Szerb, 1980).

En base a lo expuesto, resultaba de sumo interés examinar los probables cambios en los RChM corticales y en la actividad de AChE, luego de deafferentación colinérgica producida por extensas lesiones del nBM en la rata.

2.6. Efectos del "stress" sobre algunos parámetros colinérgicos en el SNC.

La condición de "stress" puede ser considerada como una consecuencia de un estímulo exagerado o inusual, que altera de algún modo el "equilibrio" de un organismo y que produce cambios fisiológicos y comportamentales, que implican en general una tendencia a readaptarse a la nueva situación (Anisman, 1978).

El "stress" produce numerosos cambios neuroquímicos y hormonales, como por ejemplo la modificación de la síntesis y liberación de neurotransmisores en el cerebro, tal como ocurre con la noradrenalina y la serotonina. A medida que aumenta la severidad del estímulo en cuestión, también puede resultar involucrado el sistema dopaminérgico (Anisman, 1978).

Distintos investigadores han puesto de relieve la im-

portancia de los mecanismos colinérgicos en algunos aspectos particulares del comportamiento ; según Russell (1982) "... tanto el sistema colinérgico periférico como el central, juegan un papel esencial en la capacidad del organismo para adaptarse a las demandas del medio ambiente, particularmente cuando los límites de tolerancia tienden a ser excedidos."

A pesar de la abundante literatura sobre los cambios neuroquímicos producidos por situaciones "estresantes", es poco lo que se conoce acerca de sus efectos sobre los receptores sinápticos centrales.

Si bien hay algunos antecedentes en la bibliografía sobre estudios relacionados con el sistema colinérgico y diferentes condiciones de "stress", en general se refieren al neurotransmisor ACh; pero son muy escasas las referencias a los receptores colinérgicos. Karczmar y col. (1973) comprobaron que, en situaciones de "stress" ineludibles, aumentan los niveles de ACh y de serotonina en el cerebro. Saito y col. (1976) observaron que un entrenamiento de evitamiento pasivo no alteró los niveles de norepinefrina, dopamina, serotonina ni ACh, pero la inmersión en agua fría disminuyó el contenido de norepinefrina y aumentó el de ACh cerebrales.

Se seleccionó una forma de producir "stress" que resultara ineludible: someter a ratas a natación forzada en agua relativamente fría. El modelo parece adecuado para estudiar regulación de los RChM "in vivo" en condiciones fisiológicas.

CAPITULO II.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES Y METODOS GENERALES.

1.1. Obtención del material biológico.

En todos los casos los animales fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros se disecaron rápidamente en frío, obteniéndose las áreas correspondientes a los distintos grupos de experimentos. El tejido se homogeneizó en sacarosa 0.32 M y se guardó a -60°C o se fraccionó inmediatamente, según los requerimientos de los diferentes ensayos.

1.2. Fraccionamiento. (De Robertis y col., 1966)

Los homogenatos fueron centrifugados a 1000 g durante 10 minutos (min) en un rotor Sorvall SS34, para separar la fracción pesada o nuclear; el precipitado se rehomogeneizó en sacarosa 0.32 M y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores; los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se reunieron y volvieron a centrifugarse a 30.000 g durante 30 min. El sedimento resultante corresponde a la fracción mitocondrial cruda o fracción cruda de membranas del tejido nervioso que contiene sinaptosomas, mitocondrias y mielina. Dicho sedimento fue resuspendido en una solución "buffer" de PO_4^{3-} , Na^+ , K^+ , 50 mM, de pH 7.4. Se almacenó a -60°C .

1.3. Determinación del contenido proteico.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (1951). Se tomaron alícuotas de las fracciones de membranas y se les agregó 0.1 ml de NaOH 1 N; se dejaron a temperatura ambiente durante 15 min. Luego se agregó 1 ml de la siguiente solución: 1 tartrato de Cu 0.02 % : 50 carbonato de Na 2 %. Luego de 10 min se agregó 0.1 ml de

reactivo de Folin Ciocalteu con agua en partes iguales (1 N).

A los 30 min se leyeron los resultados en un espectrofotómetro, a 750 nm de longitud de onda. Se compararon con los obtenidos simultáneamente con concentraciones conocidas de albúmina bovina: 20, 40, 60, 80 y 100 μ gr por ml. Con estos datos se construyó una curva standard, aproximándola a una recta por el método de "cuadrados mínimos".

1.4. Fijación específica de $[^3\text{H}]$ -QNB. (Yamamura y Snyder, 1974a)

Se prepararon tubos de ensayo conteniendo alícuotas de homogenatos o fracciones crudas de membranas, diluidas con "buffer" PO_4^{3-} , Na^+ , K^+ , 50 mM, pH 7.4, hasta una concentración final de 0.1 mgr de proteína por ml.

Se incubaron con $[^3\text{H}]$ -L-QNB en concentraciones desde 0.02 hasta 2 nM, repitiéndose cada concentración por cuadruplicado, en un baño a 37°C durante 60 min, para obtener los datos sobre la fijación total del ligando radioactivo. Para determinar la unión específica, se determinó la fijación inespecífica en alícuotas preincubadas con atropina, en una concentración final de 5 μ M; y luego se las incubó paralelamente a las anteriores con el ligando radioactivo.

El proceso se detuvo con el mismo "buffer" de incubación a 4°C y colocando los tubos sobre hielo. El contenido de cada muestra fue filtrado según el método de Fields y col. (1978) utilizando filtros Whatman GF/B. Fueron lavados tres veces con "buffer" frío y se secaron en una estufa a 80°C durante 4 horas.

Los filtros secos fueron colocados en viales y se les agregó 5 ml de mezcla de Bray (1960); luego de agitarlos sua-

vemente se contaron en un espectrómetro Tracor para centelleo líquido.

La fijación específica se obtuvo como la diferencia entre la unión total y la inespecífica, que en ningún caso representó más del 15 % de la total y que fue menor del 10 %, cuando se usaron concentraciones de la droga radioactiva mayores de 0.2 nM.

La actividad específica del ligando radioactivo fue de 31 Ci/mmol y fue obtenido de New England Nuclear. La atropina fue adquirida a Mann Research.

1.5. Determinación de la actividad de AChE

Para ensayar la actividad de AChE de los homogenatos o fracciones de membranas, se utilizó como sustrato acetil-tio-colina (ATC) y como reactivo coloreado, ácido di-tio-bis-nitrobenzoico (DTNB) o reactivo de Ellman (Ellman y col., 1961), que al reaccionar con los productos de la hidrólisis de ATC, tiene máxima absorción en la longitud de onda de alrededor de 412 nm.

Los reactivos y la correspondiente alícuota a ensayar, se colocaron directamente en una cuba de cuarzo para espectrofotómetro, conteniendo "buffer" PO_4HNa_2 , $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$, 100 mM de pH 8. En un volumen final de alrededor de 3 ml, se agregaron 100 μl de reactivo de Ellman, 20 μl de ATC 75 mM y la muestra problema. La reacción se siguió en un espectrofotómetro digital Cecil, realizando las lecturas cada 15 segundos y graficándolas en función del tiempo, durante 3 min. De la pendiente de la curva se obtuvo la variación en la absorbancia, que permitió calcular la actividad específica de la enzima como μmoles de ATC hidrolizada por min y por mgr

de proteína. Se utilizó BW 284 C 51 como inhibidor específico de la AChE. La actividad de pseudocolinesterasa se ensayó con butiril-tio-colina como sustrato, representando como máximo, el 10 % de la actividad total de la enzima.

Tanto la ATC como la butiril-tio-colina y el DTNB, fueron adquiridos a Sigma. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

2. METODOS ESPECIALES

2.1. Desarrollo ontogenético de los RChM y de la actividad de AChE.

2.1.1. Animales de experimentación.

Se incubaron huevos embrionados de pollo hasta el momento de ser utilizados. Algunos embriones siguieron su desarrollo hasta el nacimiento y otros hasta los 12 días de vida, en cuyo caso fueron mantenidos a 38°C, con períodos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con agua y alimento balanceado "ad libitum".

2.1.2. Aislamiento de las distintas áreas cerebrales.

Recién en el 8° día del desarrollo embrionario aparecen las características del cerebro de las Aves en el embrión de pollo. Al 10° día se estrechan los ventrículos laterales y se engrosa la región palial. En el 12° día se puede considerar que están presentes todas las masas celulares del adulto.

El cerebro fue disecado en cinco regiones anatómicas:

1) región palial de los hemisferios cerebrales, correspondiente a "hyperstriatum" y "neostriatum",

2) región basal de los hemisferios correspondiente al "paleostriatum",

3) lóbulos ópticos, correspondientes al "tectum opticus" ,

4) región correspondiente al resto del mesodiencéfalo,

5) cerebelo.

La elección de las áreas a analizar se basó en datos anatómicos del libro de "Anatomía Comparada del Sistema Nervioso de los Vertebrados" de Ariëns Kappers y col. (1936). (Fig.2). Dichas regiones se reconocieron en cortes histológicos seriados y se compararon con los datos anatómicos e histológicos de Stingelin y Senn (1969), sobre cerebro de paloma, búho y gorrión.

Se ensayó la disección desde los 8 días del desarrollo, pero las áreas en cuestión sólo pudieron ser visualizadas claramente bajo lupa, a partir del 11° día. Entonces los embriones fueron sacrificados en el 11°, 13°, 15°, 17°, 19° días del desarrollo, y el resto fue decapitado el día del nacimiento y a los 12 días. Estas edades, referidas al día de la eclosión tomado como día 0, corresponderían aproximadamente a los días -10, -8, -6, -4, -2 y +12 respectivamente.

Todos los animales fueron sacrificados a la misma hora del día (alrededor de las 11 horas) para descartar la posibilidad de variaciones en los parámetros analizados, debidas a ritmos diarios, ya que al menos en la rata, Wood y Rose (1979) encontraron un ritmo de baja amplitud en los niveles de AChE de la corteza motora.

Con los animales adultos se procedió de igual modo, pero fueron sacrificados en la planta ubicada en Pilar, perte-

neciente a la empresa "San Sebastián", que los obsequió. Los cerebros fueron transportados en frío y luego se disecaron las áreas correspondientes.

2.1.3. Muestras para los ensayos de fijación de $[^3\text{H}]$ -L-QNB y para la determinación de AChE.

Para homogeneizar el material se procedió como se describió anteriormente (ver 1.1. en este mismo capítulo). Luego se lo centrifugó a 100,000 g durante 60 min, se resuspendió el sedimento y se almacenó a -60°C .

Cada muestra contenía el material correspondiente al cerebro de dos embriones, pero en los casos de los más jóvenes, como los cerebros eran muy pequeños, se utilizaron entre tres y cinco embriones por experimento.

Los ensayos se llevaron a cabo como se describió en 1.3, 1.4 y 1.5, en este mismo capítulo.

2.2. Influencia de la deprivación visual sobre los RChM y la actividad de AChE.

2.2.1. Animales de experimentación.

Huevos embrionados de pollo fueron colocados en la incubadora sin luz y dejados allí hasta aproximadamente ocho horas después de la eclosión, tiempo en que su plumón se había secado y los animalitos eran resistentes a pequeños cambios de temperatura.

Siempre en la oscuridad, eran retirados de la incubadora en una caja térmica para ser trasladados a un cuarto oscuro calefaccionado, donde se les colocaba un cono negro de cartulina sobre uno de los ojos; esta operación se realizaba con luz verde muy tenue y distante.

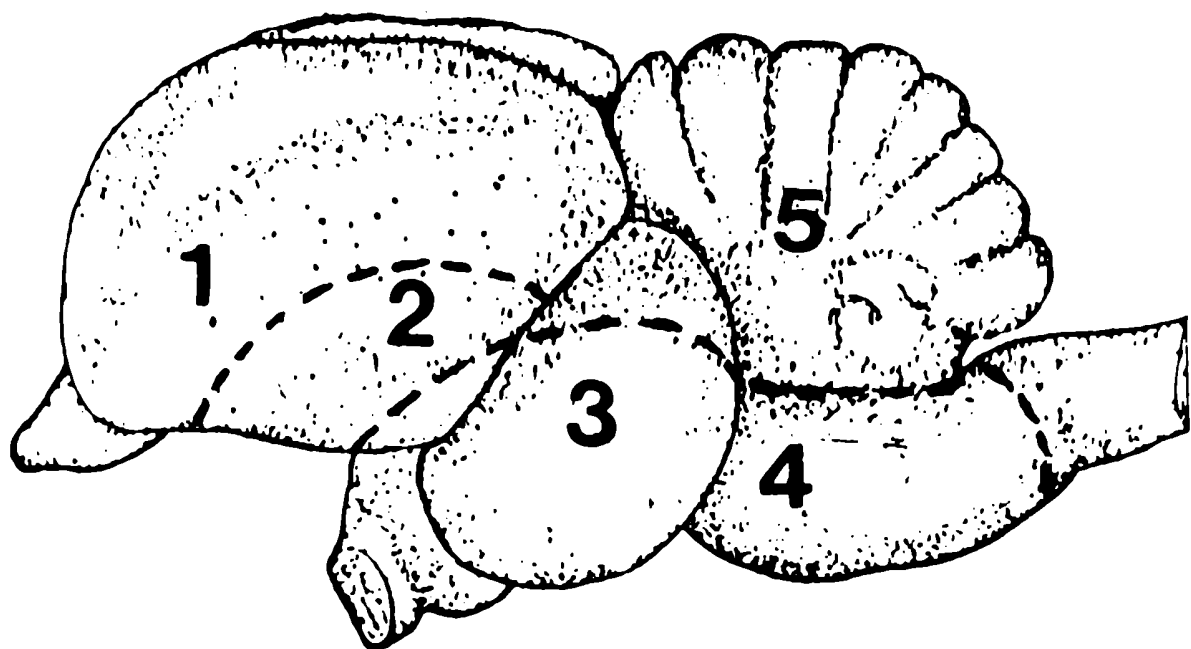


Figura 2. Esquema de cerebro de pollo, vista lateral.

En líneas de puntos se indican las divisiones entre las diferentes zonas consideradas:

- 1: hiperestriado + neostriado; 2: paleoestriado;
- 3: lóbulos ópticos; 4: resto del mesodiencéfalo;
- 5: cerebelo.

Los animales fueron mantenidos en grupos de seis a ocho, en cajas de 30x40x30 cm, con períodos alternados de 12 horas de luz y 12 de oscuridad; la temperatura se mantuvo entre 38 y 39°C y se les dio agua y alimento balanceado "ad libitum".

2.2.2. Areas cerebrales y tiempos seleccionados para realizar los ensayos.

Se disecaron los lóbulos ópticos por separado y se homogeneizaron según se describió en 1.1 (Cap. II). También se disecaron las regiones correspondientes a "hyperstriatum" + "neostriatum" y a "paleostriatum", procesando cada hemisferio por separado.

Los animales fueron sacrificados a las 24, 48 y 60 horas y a los 6, 8 y 10 días de colocarles el parche. Se comprobó diariamente la firmeza del mismo y se descartaron los casos que ofrecían dudas. No se pudo continuar más allá de los diez días, ya que el recambio del plumaje ocasionaba el desprendimiento del parche.

De todos modos, el objetivo era analizar los tiempos cortos, ya que, como se mencionó en la Introducción (2.3., Cap. I), Francis y col. (1980) no detectaron cambios en los RChM luego de deaferentación de la vía retino-tectal en pollitos neonatos, hasta alrededor de los dieciocho días de vida en que observaron una pequeña caída. Y, por otra parte, los experimentos de ontogénesis también sugieren estos tiempos como los más apropiados (ver 2.3., Cap. I).

2.2.3. Ensayos de fijación de $[^3\text{H}]$ -L-QNB y de determinación de la actividad de AChE. Análisis de los resultados.

Se llevaron a cabo ensayos en animales normales, para comparar las regiones izquierdas y derechas del cerebro. Los ensayos en los animales experimentales, se realizaron simultáneamente en las muestras correspondientes a los lóbulos ópticos contralateral (LO_c) e ipsilateral (LO_i), con respecto al ojo tapado. Del mismo modo se procedió con la región "hyperstriatum+neostriatum" y con "paleostriatum".

Se consideró como LO control, el del lado ipsilateral y el análisis estadístico de los resultados se hizo utilizando el "test de Student" para datos apareados.

Para poder realizar curvas de saturación con el ligando radioactivo, contando con tan escaso material biológico, se realizaron incubaciones conteniendo 0.01 mgr de protefna por ml, aumentando el volumen total a 4 ml.

2.3. Localización de receptores muscarínicos y AChE en el hipocampo.

2.3.1. Animales de experimentación. Lesiones en el SNC.

Se utilizaron ratas Wistar machos, adultas, de 300 a 320 gr de peso. Fueron anestesiadas con pentobarbital sódico, 45 mgr por Kgr de peso corporal, por vía intraperitoneal.

Se practicaron dos orificios, uno a cada lado del bregma, desplazados 1.5 mm de la línea media. Por allí se insertó una jeringa tipo Hamilton, hasta una profundidad de 4.5 mm, desde la superficie del cráneo, quedando así ubicada en el correspondiente ventrículo lateral. (Noble y col., 1967). Se inyectaron, durante 30 segundos, 0.5 μ gr de AK, disueltos en 2 μ l de "buffer" (pH 7.4), en ambos ven-

trículos. Las ratas utilizadas como controles fueron inyectadas de igual modo pero con solución salina únicamente.

En los animales inyectados con AK se presentaron síntomas convulsivos que fueron parcialmente suprimidos por la anestesia y que duraron unas pocas horas.

Luego de 30 días las ratas fueron decapitadas, los cerebros removidos y ambos hipocampos (H) fueron disecados sobre hielo.

Unos pocos hipocampos de los mismos grupos de animales fueron utilizados para realizar estudios histológicos. Se incluyeron en parafina y los cortes, en general secciones coronales de 50 μ de espesor, se tiñeron con violeta de cresilo.

En otro grupo de animales, dos semanas después de la inyección de AK se practicó la sección unilateral de la fimbria-fórnix. También fueron sacrificados a los 30 días de la inyección. Algunos cerebros se fijaron por congelación para observar si la sección había sido completa.

2.3.2. Muestras para los ensayos de fijación de $[^3\text{H}]$ -L-QNB.

Análisis de los resultados.

Los hipocampos se prepararon como se describió en 1.1 y 1.2, en este mismo capítulo y se almacenaron las fracciones a -60°C hasta el momento de ser utilizadas.

En el caso de los animales tratados solamente con AK, ambos hipocampos se procesaron juntos y se compararon con los de los animales enteros sacrificados simultáneamente.

En el caso de los animales que además tenían lesionau

da la fimbria-fornix, los H ipsilaterales y contralaterales a la sección, fueron tratados separadamente. En este caso, los resultados fueron analizados estadísticamente, según el "test de Student" para muestras apareadas.

A su vez, los resultados fueron comparados con los de los grupos que tenían lesiones correspondientes a la inyección de AK y con los de los controles, por el "test de Student" para muestras independientes.

Los experimentos de fijación de $[^3\text{H}]$ -QNB se llevaron a cabo en alícuotas de homogenatos de H, diluidas hasta una concentración de 0.1 mgr de proteína por ml. La actividad de AChE se ensayó como se describió en 1.5 (pág. 33).

2.4. Localización de RChM y actividad de AChE en el neocortex.

2.4.1. Animales de experimentación. Lesiones del nBM.

Ratas Wistar machos, adultas, de 230 a 250 gr de peso corporal, fueron anestesiadas con pentobarbital sódico, (45 mgr/kg, i.p.) y ubicadas en un aparato estereotáxico para pequeños animales "David Kopf".

Para realizar las lesiones, se utilizaron electrodos de acero inoxidable, cuya punta tenía un diámetro de 0.4 mm; los electrodos fueron ubicados de acuerdo a las siguientes coordenadas: antero-posterior, + 6.6 mm, medio-lateral, + 2.5 mm y dorso-ventral, + 2 a 2.8 mm, según el "Atlas Estereotáxico del Cerebro de la Rata", de König y Klippel (1963). La lesión unilateral del nBM, se efectuó aplicando una corriente anódica constante de 2 mA, durante 20 a 25 segundos.

Como controles se utilizaron animales con operación simulada, colocándose los electrodos del mismo modo pero

omitiendo el pasaje de corriente, y animales enteros.

Para determinar el lugar y la extensión de las lesiones, algunos cerebros fueron fijados por congelación; se realizaron cortes seriados de 50 μ de espesor y se tiñeron con violeta de cresilo.

2.4.2. Muestras para ensayar la fijación de $[^3\text{H}]\text{-L-QNB}$ y la actividad de AChE. Tiempos estudiados.

A los tres y catorce días, luego de la lesión o de la operación simulada, las ratas fueron sacrificadas; se separó la sustancia gris de la corteza cerebral, correspondiente a los hemisferios ipsilateral y contralateral a la lesión. Se homogeneizaron y se fraccionaron por separado, siguiendo los procedimientos descritos en 1.1 y 1.2 (Cap. II). Se determinó el contenido proteico, según se describió en 1.3 y se realizaron los ensayos como se indicó en 1.4 y en 1.5 (Cap. II)

Del mismo modo se procedió con los animales controles que no habían recibido tratamiento alguno.

2.4.3. Análisis de los resultados.

Se compararon las hemicortezas entre sí, en cada caso y con las de los otros grupos, tanto en el contenido proteico como en el nivel de RChM y en la actividad de AChE; cuando se trataba de las hemicortezas de un mismo animal, los datos se analizaron estadísticamente por el "test de Student" para muestras apareadas; en los demás casos, se utilizó el "test de Student" para muestras independientes.

2.5. Efectos del "stress" agudo sobre los RChM del SNC.

2.5.1. Animales de experimentación. Tratamiento.

Ratas Wistar adultas, de ambos sexos, de entre 220 y 250 gr de peso, fueron forzadas a nadar en grupos de cinco a siete animales, en un recipiente de 60 x 40 x 30 cm, lleno de agua a $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 15 min.

Los animales mostraban signos de agotamiento, pero eran capaces de recuperarse completamente.

Otros animales, criados paralelamente, fueron utilizados como controles.

2.5.2. Areas cerebrales y tiempos seleccionados para realizar los ensayos de fijación de $[^3\text{H}]\text{-L-QNB}$.

Las ratas fueron decapitadas inmediatamente después de someterlas al tratamiento "estresante", a los 60 min o a las 24 horas. Momentos antes se sacrificaron los animales controles, correspondientes al "tiempo cero" en los experimentos.

Se disecaron: la corteza cerebral, la formación hipocámpica, la amígdala, el hipotálamo, los ganglios basales ("striatum" + "globus pallidus"), el tallo cerebral, los bulbos olfatorios y el cerebelo. El material fue homogeneizado y fraccionado como ya se describió en 1.1 y en 1.2, procesándose conjuntamente las áreas correspondientes a cuatro o cinco cerebros. La determinación del contenido proteico y los ensayos de fijación del ligando radioactivo se llevaron a cabo simultáneamente en muestras de los animales experimentales y de los controles, de cada región. Por supuesto estos resultados fueron analizados como correspondientes a muestras independientes.

CAPITULO III.

RESULTADOS Y DISCUSION PARCIAL

1. RESULTADOS GENERALES PARA LOS EXPERIMENTOS DE FIJACION
DE $[^3\text{H}]$ -L-QNB.

1.1. Consideraciones generales sobre las características de
la fijación del antagonista radioactivo

Las curvas de saturación mostraron, en todos los casos, una típica forma hiperbólica, que se achata a partir de las concentraciones de droga libre entre 0.3 y 0.5 nM, como puede observarse en la figura 3.a.

Estos resultados se graficaron de acuerdo con la ecuación de Scatchard (1949), obteniéndose así la constante de disociación aparente (K_D) que varió según las regiones cerebrales y el tipo de preparación, pero que siempre correspondió a uniones de alta afinidad, ya que sus valores estuvieron comprendidos entre 0.05 y 0.3 nM aproximadamente.

El número máximo de sitios de unión calculado ($B_{\text{máx}}$), también varió en las diferentes áreas y en las distintas preparaciones. En general, los ensayos realizados en homogenatos totales dieron valores de $B_{\text{máx}}$ menores que los realizados en fracciones crudas de membranas, debido probablemente a que en estas últimas, hay mayor concentración de proteínas de membrana, entre ellas de receptores.

Se obtuvieron buenos coeficientes de correlación lineal, por lo que se sugiere la existencia de un solo tipo de sitios de unión para QNB (fig. 3.b.).

El número de Hill (N_H) calculado del gráfico correspondiente, fue siempre cercano a la unidad, lo que refuerza la presunción de una sola clase de sitios de unión (fig. 3.c.).

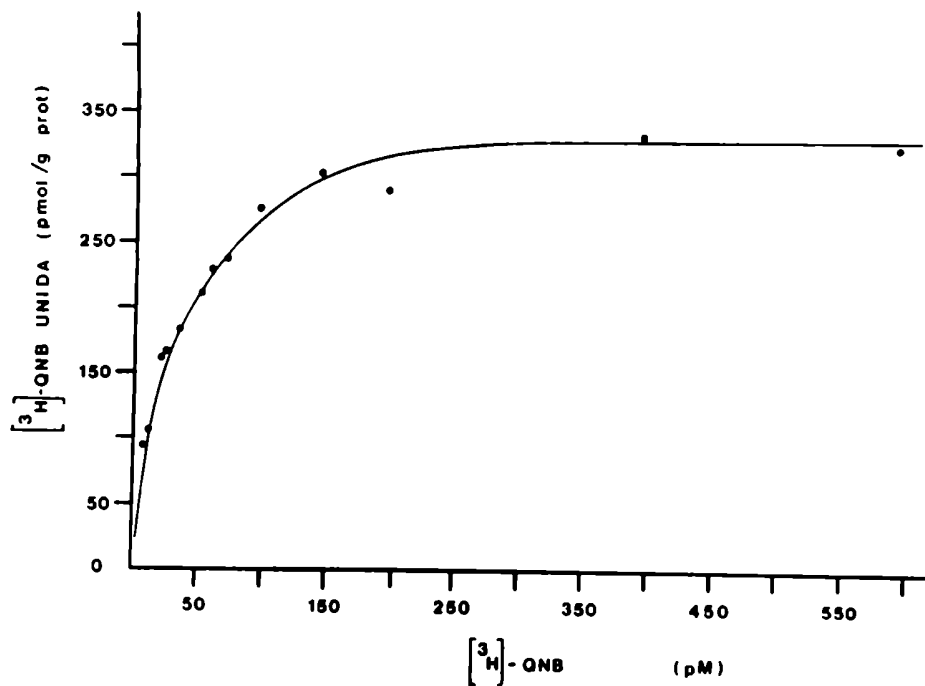


Figura 3 a: Curva de saturación correspondiente a la unión específica del antagonista muscarínico [³H]-QNB a membranas de hipocampo de rata.
 Ordenadas: picomoles de [³H]-QNB unido específicamente por gramo de proteína de membranas.
 Abscisas: concentración de [³H]-QNB (pM).

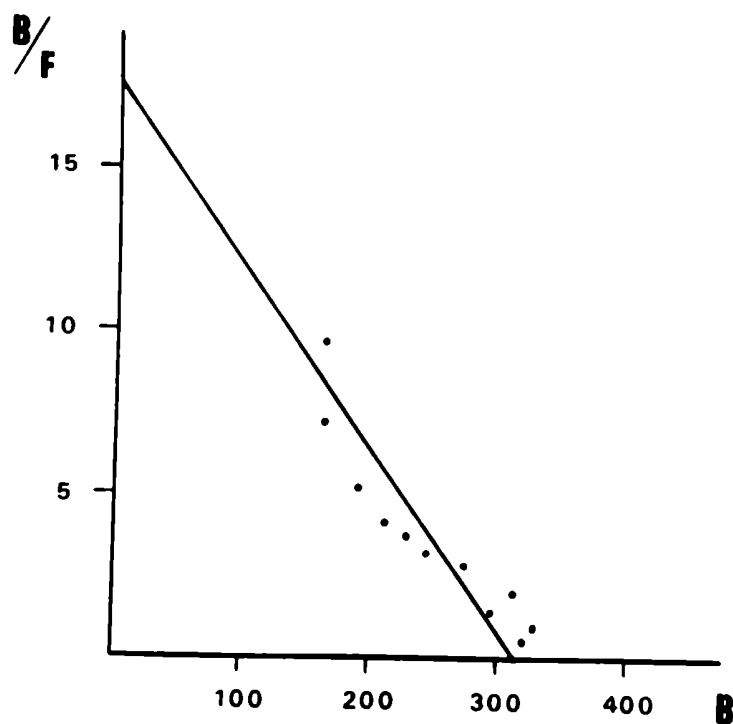


Figura 3 b: Representación del análisis de Scatchard correspondiente a la fijación específica del antagonista muscarínico $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ a membranas de hipocampo de rata. (Los datos son los mismos de la figura 3 a).
 Ordenadas: B/F corresponde a pmoles de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ unido específicamente por gramo de proteína / concentración de la droga libre (pM).
 Abscisas: B corresponde a pmoles de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ unido específicamente por gramo de proteína de membranas.

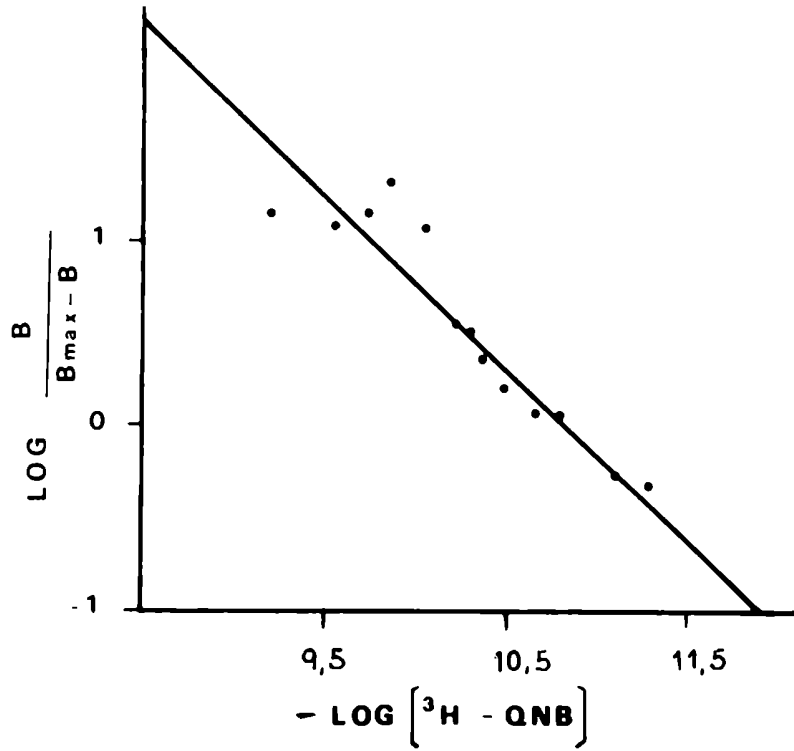


Figura 3 c: Gráfico de Hill correspondiente a la fijación específica de $[^3\text{H}]$ -QNB a membranas de hipocampo de rata. Los datos y unidades se corresponden con los de las figuras 3 a y 3 b.

2. RESULTADOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE EXPERIMENTOS.

2.1. Desarrollo ontogénico de los RChM y de la actividad de AChE.

2.1.1. Contenido de proteínas en las diferentes regiones cerebrales, durante el desarrollo.

En las cinco regiones estudiadas: 1) "hyperstriatum" + "neostriatum", 2) "paleostriatum", 3) lóbulos ópticos, 4) resto del mesodiencéfalo y 5) cerebelo, se duplicó el contenido proteico entre los días -10 y +12, con respecto al nacimiento, considerado como día cero.

En los animales adultos, con excepción de los lóbulos ópticos, pudo observarse una reducción en la concentración de proteínas (tabla 1.a).

Si se considera cada región por separado, existen algunas diferencias en el contenido proteico y en su ritmo de crecimiento. Cuando se expresa el contenido total de proteína por región, se ve reflejado el desarrollo de cada área (tabla 1.b).

Resulta interesante observar las diferencias de este parámetro, entre regiones. Mientras la región 1 incrementa su contenido proteico diecisiete veces, entre el día -10 y el adulto, la región 5 (cerebelo) incrementa noventa y cuatro veces en igual período (tabla 1.b).

También existen diferencias en la vida postnatal que llaman la atención: mientras que en las regiones 1, 3 y 4 no hay cambios significativos entre el día +12 y el adulto, en las regiones 2 (basal) y 5, la proteína total duplica su

TABLA 1 a. Concentración de protefnas en el cerebro del pollo en desarrollo.

Edad (días)	Región				
	1	2	3	4	5
-10	40 ± 4	38 ± 2.4	37 ± 5.4	38 ± 3.9	29 ± 9
-8	35 ± 4	47 ± 7	34 ± 5.3	41 ± 3	36 ± 5.4
-6	42 ± 4	46 ± 1	41 ± 4	40 ± 3.8	42 ± 2.8
-4	45 ± 5	49 ± 3.2	41 ± 5	60 ± 13	47 ± 2
-2	46 ± 8	56 ± 8	49 ± 8	69 ± 10	56 ± 6.3
0	59 ± 6	65 ± 9.3	39 ± 3.7	77 ± 16	64 ± 5
+12	68 ± 13	102 ± 20	80 ± 17	83 ± 15.6	70 ± 6.7
Adulto	36 ± 6	49 ± 3	80 ± 5	67 ± 11	59 ± 8

Regiones: (1) neo- e hiperstriatum; (2) paleostriatum; (3) lóbulos ópticos; (4) mesodiencefalo; (5) cerebello.

Edad: en días antes de la eclosión.

Resultados: en mg de protefna/g de tejido. Cada valor es la media de cuatro experimentos realizados por triplicado ± error estándar (ESM).

TABLA 1 b. Contenido total de proteínas en el cerebro del pollo en desarrollo.

Edad (días)	Región				
	1	2	3	4	5
-10	3.7 ± 0.6	3.4 ± 0.3	4 ± 0.4	4.1 ± 0.6	0.5 ± 0.2
-8	7.6 ± 0.4	4.4 ± 0.5	6.4 ± 1.9	8.1 ± 1.3	1.7 ± 0.4
-6	12.2 ± 1.5	7.3 ± 1.2	7.7 ± 2.9	9.8 ± 2	3.1 ± 0.2
-4	17.6 ± 3.4	10.8 ± 3	11.2 ± 1.9	16.8 ± 5.2	6.7 ± 1.4
-2	25.5 ± 5.4	10 ± 0.9	12.9 ± 3.5	20 ± 2.8	10.9 ± 1.8
0	36.2 ± 8.2	16.5 ± 2.4	14.5 ± 4.5	30.9 ± 4.2	16.9 ± 2.1
+12	65.3 ± 15.2	31.4 ± 6.2	42.4 ± 9.5	33.9 ± 8.2	22.3 ± 4
Adulto	63 ± 9	64 ± 8	38 ± 7.2	31 ± 4.3	47 ± 8

Regiones: (1) neo- e hiperstriatum; (2) paleostriatum; (3) lóbulos ópticos; (4) mesodiencefalo; (5) cerebelo.

Edad: en días antes de la eclosión.

Resultados: en mg de proteína por cerebro. Cada valor es la media de cuatro experimentos realizados por triplicado ± error estándar (ESM).

valor.

En general, puede decirse que la concentración de proteínas alcanza un valor máximo en el día +12, en todas las regiones, manteniéndose o disminuyendo en el adulto.

2.1.2. Fijación de [^3H]-QNB y actividad de AChE.

En los homogenatos de cerebro total de pollo adulto, la constante de disociación aparente, K_D , fue de 0.28 nM, similar a la obtenida por Enna y col. (1976).

Los datos de la tabla 2.a indican la concentración del número máximo de sitios de unión específicos para [^3H]-QNB ($B_{\text{máx}}$ expresada en fmol/mg de proteína), que es una medida de la densidad de los receptores muscarínicos.

La tabla 2, en su parte b, da el número total de receptores por región (expresado en fmol).

Como en el caso de lo ocurrido con el contenido de proteínas, las diferencias en la fijación específica entre distintas regiones fueron notables. (Ver tabla 2.a y b).

En la región 1 se triplicó la densidad de receptores entre los días -10 y -8; luego, este parámetro permaneció estable hasta el día -2, para incrementar marcadamente al tiempo de la eclosión; como se observa en la tabla 2.a., entre el día -10 y el valor en el adulto hay un aumento de ciento sesenta veces en la fijación total, lo que refleja el gran desarrollo del hiperestriado y del neostriado. Sin embargo, la velocidad de este incremento varía a lo largo de la ontogénesis (tabla 2.b). (Fig. 4).

En la región 2 (paleostriado) la densidad de los receptores va aumentando gradualmente, hasta alcanzar un máxi

mo al nacimiento (380 fmol/mg prot.), alcanzando un valor mayor aún en el adulto (613 fmol/mg prot.). En esta región basal, la fijación total también aumenta gradualmente, hasta llegar, en el adulto, a ser ciento veinticuatro veces la de los embriones más jóvenes (fig. 5 ; tabla 2.a y b).

En las regiones 3 y 4, la densidad es elevada en el día -10, siguiéndole un aumento menos marcado que en las regiones 1 y 2. El número total de sitios aumenta veintiuna veces en 3 y sólo cuatro veces, en la región 4. (Tabla 2.a y b).

En el cerebelo (5), se encuentra la menor densidad de receptores muscarínicos; el máximo se alcanza al nacer y en el adulto hay una reducción, obteniéndose un valor tres veces menor que en el recién nacido. (Tabla 2.a). A pesar de ello, el número total de sitios por cerebelo aumenta cuarenta y cinco veces durante la ontogénesis, reflejando el gran crecimiento en tamaño de esta región. (Fig. 8 ; tabla 2.b).

Las figuras 4 a 8 ilustran el porcentaje de variación en la concentración de RChM, medida en fmol/g de tejido y en la actividad de AChE, expresada en $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ de tejido. El cien por ciento corresponde al día cero, lo que permite poner en evidencia más claramente los cambios pre- y postnatales.

Por ejemplo en la región 1 (fig. 4), el aumento en la concentración de receptores y en la actividad de AChE es bimodal, con una meseta entre los días -8 y -4 y un máximo en el día +12, seguido de una disminución de ambos parámetros en el adulto.

TABLA 2 a. Sitios de unión específica para $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en el cerebro de pollo en desarrollo.

Edad (días)	Región				
	1	2	3	4	5
-10	50 ± 10	90 ± 10	120 ± 60	170 ± 50	90 ± 40
-8	180 ± 10	140 ± 40	180 ± 30	220 ± 30	120 ± 40
-6	180 ± 10	170 ± 30	210 ± 70	240 ± 20	130 ± 20
-4	130 ± 50	240 ± 50	340 ± 20	230 ± 30	110 ± 10
-2	190 ± 20	250 ± 60	220 ± 50	250 ± 30	120 ± 20
0	380 ± 100	380 ± 80	300 ± 100	270 ± 40	180 ± 20
+12	430 ± 110	380 ± 100	290 ± 40	320 ± 20	120 ± 30
Adulto	470 ± 114	613 ± 99	413 ± 58	361 ± 80	60 ± 4

Regiones: (1) neo- e hiperstriatum; (2) paleostriatum; (3) lóbulos ópticos; (4) mesodiencéfalo; (5) cerebelo.

Edad: en días antes de la eclosión.

Resultados: sitios de unión específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ expresados en fmoles/mg de proteína.

Cada valor representa la media de cuatro experimentos realizados por triplicado ± error estándar (ESM).

-10	180 ±	10	300 ±	60	630 ±	80	690 ±	200	60 ±	40
-8	1310 ±	40	580 ±	150	1900 ±	90	2200 ±	300	190 ±	110
-6	1910 ±	10	1380 ±	130	3090 ±	50	2730 ±	400	460 ±	110
-4	1840 ±	70	1700 ±	400	4170 ±	300	3790 ±	1070	660 ±	180
-2	4440 ±	900	2990 ±	770	5530 ±	800	5660 ±	1000	1290 ±	380
0	10300 ±	1540	4770 ±	1300	6960 ±	1340	8100 ±	340	2840 ±	210
+12	16200 ±	660	10900 ±	3500	12300 ±	1750	10630 ±	1200	3060 ±	530
Adulto	28840 ±	3510	37204 ±	2960	13437 ±	1267	10953 ±	2100	2721 ±	240

Regiones: (1) neo- e hiperstriatum; (2) paleostriatum; (3) lóbulos ópticos; (4) mesodiencefalo; (5) cerebelo.

Edad: en días antes de la eclosión.

Resultados: sitios totales de unión específica para [³H]-QNB en cada región, expresados en fmoles (fmoles/cerebro). Cada valor representa la media de cuatro experimentos realizados por triplicado ± error estándar (ESM).

En la región 2 (fig. 5) hay un aumento gradual en la concentración de los receptores, tanto antes como después del nacimiento, llegando a ser el 212 % a los 12 días de vida, sufriendo una reducción al 152 % en el adulto. El modo de desarrollo de la actividad de la enzima es semejante al de los RChM, pero con un máximo del orden del 150 % a los 12 días.

En la región 3 (LO), el desarrollo de la concentración de los RChM es muy similar al de la región 2, con un máximo de alrededor de 160 % en el día +12, pero difieren un poco en la actividad de AChE que, partiendo de un valor menor del 50 % en el día -2, alcanza un máximo de 187 % en el día +12, como se observa en la figura 6.

En la región 4 (fig. 7), tanto la densidad de los receptores como la actividad de la enzima resultan bimodales en su desarrollo, recordando a la región 1, con una meseta entre los días -8 y -4, aumentando luego hasta el nacimiento, en que se alcanza una nueva meseta, cuyos valores se mantienen en el adulto.

Por último, en el cerebelo (región 5, fig. 8) hay una diferencia marcada en el desarrollo de los dos parámetros estudiados. Mientras la actividad de AChE se incrementa de manera sostenida, con mayor velocidad desde el día -2, llegando a ser el 164 % del neonato en el adulto, la concentración de los receptores muestra una curva bimodal, con una meseta entre los días -8 y -4, seguida por un máximo en el nacimiento. El hallazgo que parece más notable es la gran reducción postnatal en la concentración de RChM que, en el adulto, alcanza a ser sólo el 30 % del valor del re-

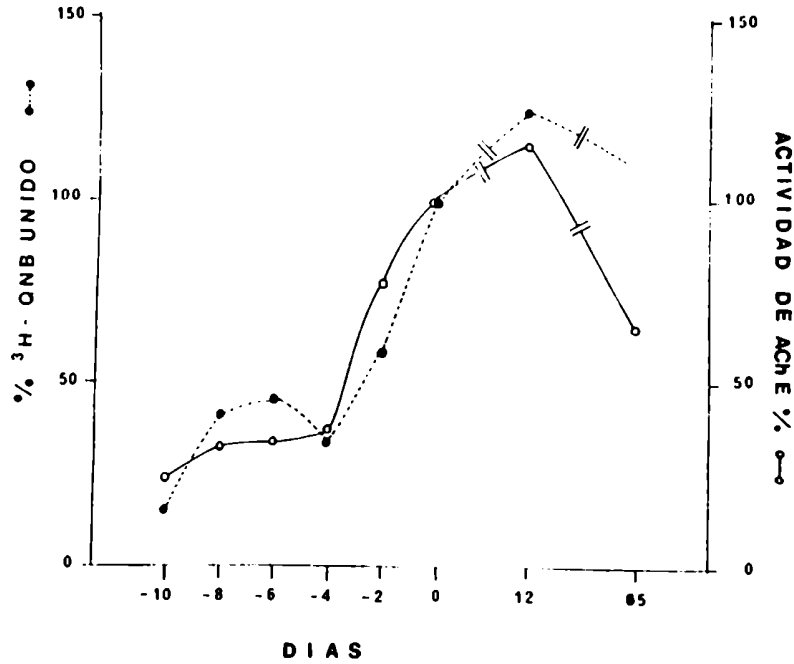


Figura 4: Ontogénesis de RChM y de actividad de AChE en hiperestriado + neostriado (región 1) del cerebro de pollo. Ordenadas: unión específica de ^3H -QNB y actividad de AChE en porcentajes, tomando como 100% los valores obtenidos en el día de la eclosión (día 0). Actividad de AChE del día cero: $6.76 \mu\text{mol}/\text{min.g}$ de tejido.

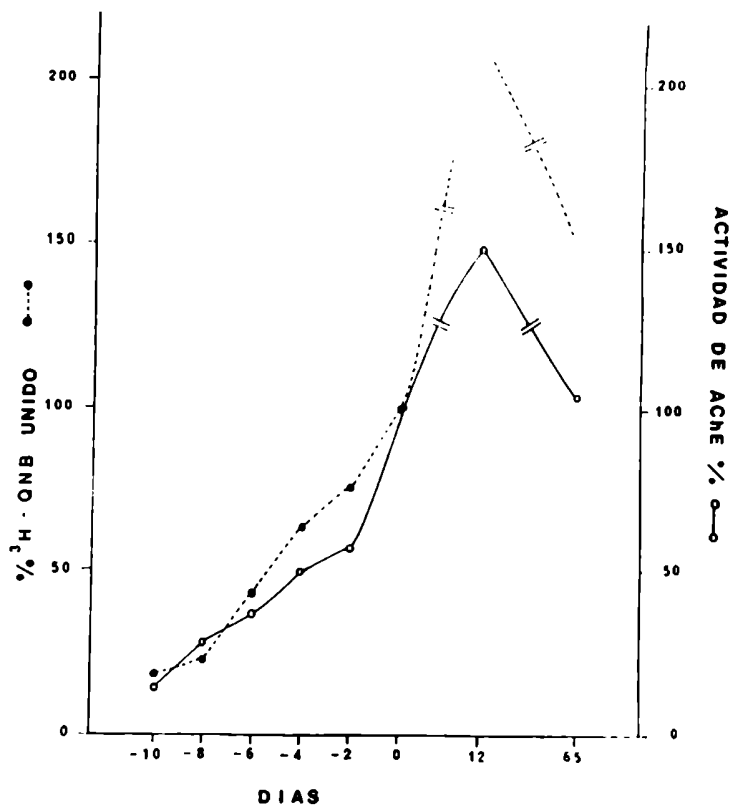


Figura 5: Ontogénesis de RChM y de actividad de AChE en paleo-estriado del cerebro de pollo (región 2).

Ordenadas: unión específica de $[\text{}^3\text{H}]\text{-QNB}$ y actividad de AChE en porcentajes, tomando como 100% los valores obtenidos en el día de la eclosión (día 0).

Actividad de AChE del día cero: $9.74 \mu\text{mol}/\text{min.g}$ de tejido.

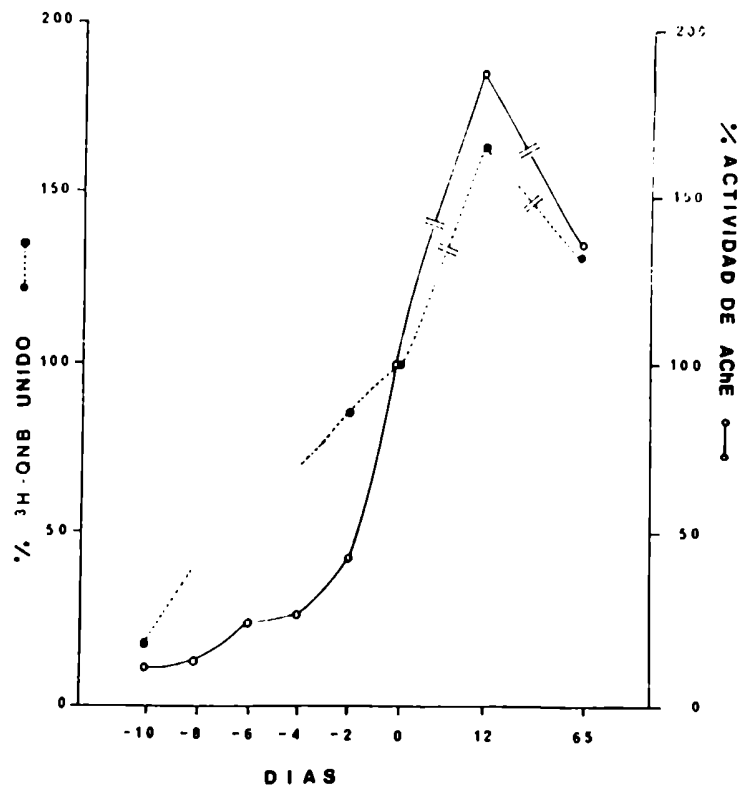


Figura 6: Ontogénesis de RChM y de actividad de AChE en lóbulos ópticos (región 3) del cerebro de pollo. Ordenadas: unión específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ y actividad de AChE en porcentajes, tomando como 100% los valores obtenidos en el día de la eclosión (día 0). Actividad de AChE del día cero: $13.86 \mu\text{mol}/\text{min.g}$ de tejido.

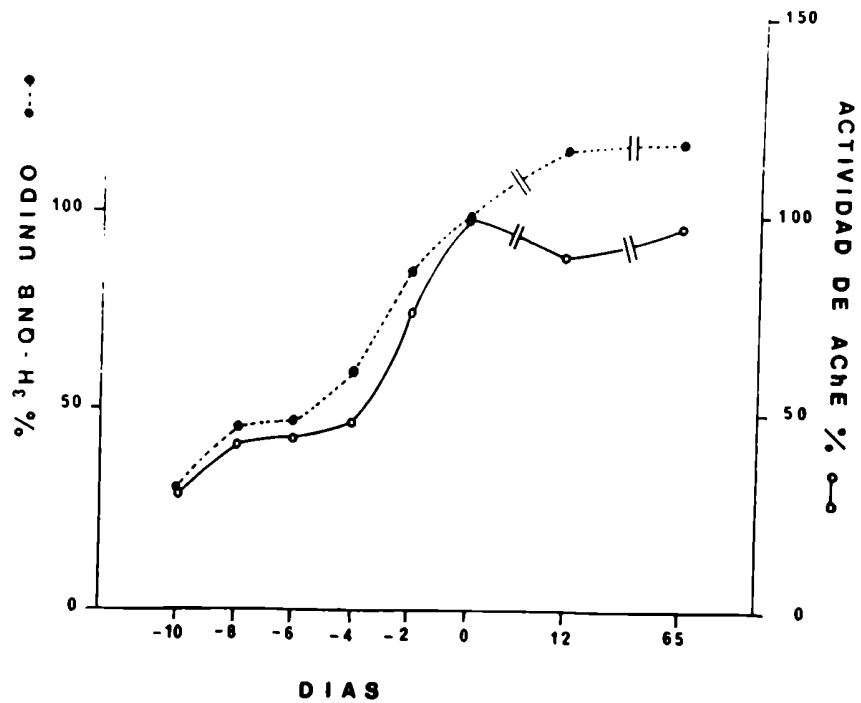


Figura 7: Ontogénesis de RChM y de actividad de AChE en la región 4, correspondiente al resto del mesodiencefalo, del cerebro de pollo.

Ordenadas: unión específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ y actividad de AChE en porcentajes, tomando como 100% los valores obtenidos en el día de la eclosión (día 0).

Actividad de AChE del día cero: $10.48 \mu\text{mol}/\text{min.g}$ de tejido.

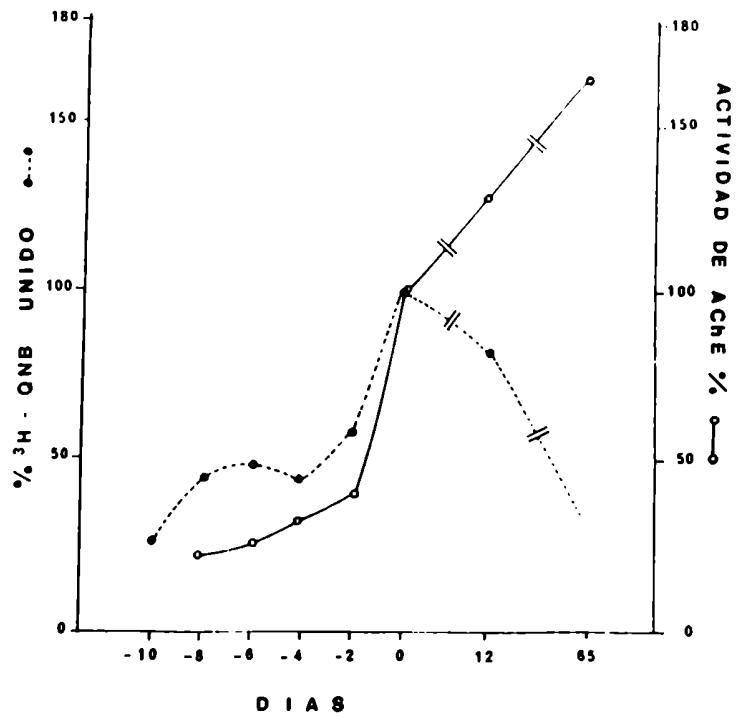


Figura 8: Ontogénesis de RChM y de actividad de AChE en el cerebelo (región 5) de pollo.

Ordenadas: unión específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ y actividad de AChE en porcentajes, tomando como 100% los valores obtenidos en el día de la eclosión (día 0).

Actividad de AChE del día cero: $9.67 \mu\text{mol}/\text{min.g}$ de tejido.

cién nacido.

2.1.3. Discusión sobre los resultados obtenidos en los estudios sobre el desarrollo ontogenético de los RChM y de la actividad de AChE.

Los resultados expuestos en 2.1.1 y 2.1.2, en relación con la densidad de los receptores, muestran que el cerebelo es la única región que posee un valor definitivamente bajo al nacimiento (180 fmol/mg prot.), mientras que en las demás regiones la densidad varía entre 270 y 380 fmol/mg de proteína (tabla 2.a).

Dichos valores resultan algo más elevados que los obtenidos por Enna y col. (1976) en homogenatos de cerebro total de pollo (140 fmol/mg prot.), lo que puede explicarse porque en el presente trabajo, los experimentos de fijación de [^3H]-QNB se realizaron en una fracción sinaptosomal cruda, en la cual se ha alcanzado cierto grado de purificación.

Si bien se han estudiado sólo dos períodos postnatales, es evidente que hay diferencias ontogenéticas, tanto antes como después del nacimiento, entre las cinco regiones consideradas:

i. En el hiper- y neostriado (1), en el paleoestriado (2) y en los lóbulos ópticos (3), se alcanza el máximo en la fijación de [^3H]-QNB y en la actividad de la enzima, ambas consideradas por gramo de tejido fresco, en el día 12 de vida postnatal; luego, en el día 65, hay una disminución de diferentes magnitudes, en la concentración de los RChM. Tales decrementos pueden interpretarse como el resultado de la "dilución" de los componentes colinérgicos, entre otros de

diferente naturaleza, como puede ser el caso de la mielina.

ii. Las concentraciones más altas de RChM se encuentran en la región 2, correspondiente al paleoestriado (613 fmol/mg prot.), homólogo de regiones del caudado-putamen y del globo pálido de los Mamíferos. Es precisamente en esa región, donde se encuentra una alta concentración de RChM en las especies de Mamíferos estudiadas (Yamamura y col., 1974; Kloog y col., 1979).

Tanto en dicha región como en los lóbulos ópticos, la cantidad total de receptores se ha duplicado entre la eclosión y el día +12, lo que indica un rápido crecimiento postnatal, que alcanza los valores más elevados en la región 2, en el adulto, mientras que en los lóbulos ópticos aumenta, no significativamente en el adulto, respecto del animal de 12 días. (Tabla 2.a y 2.b).

iii. El gran aumento en la actividad de la enzima y en la fijación del ligando radioactivo, en los lóbulos ópticos, que ocurre entre el día del nacimiento y el día +12, sugiere la posibilidad de que la estimulación óptica (o la experiencia visual) esté involucrada en su desarrollo. Esta hipótesis fue, luego, sometida a experimentación.

iv. La región considerada como el resto del mesodiencefalo (4), alcanzó su máximo en ambos parámetros, prácticamente el día del nacimiento, manteniéndose estos valores en el adulto (tabla 2).

v. El desarrollo de los receptores y de la enzima, en el cerebelo, presentan un caso curioso: luego del nacimiento, ambos parámetros aparecen disociados, sin guardar correlación alguna. La fijación del antagonista alcanza su máximo

al nacimiento y luego disminuye notablemente (tabla 2; fig. 8). Esta reducción sugiere la posibilidad de que esté ocurriendo un cambio cualitativo en la población neuronal del cerebelo. Yavin y Harel (1979) observaron que en el cerebelo de conejo, también tiene lugar una disminución pronunciada de la concentración de los RChM, luego del nacimiento.

En cuanto a la actividad de AChE, es importante tener en cuenta que la enzima puede estar localizada tanto pre- como postsinápticamente y que, durante la ontogénesis, puede encontrarse actividad enzimática en células que luego la pierden (Silver, 1971; Lehmann y Fibiger, 1979).

El día del nacimiento, la actividad de AChE alcanzó valores entre, un mínimo de 149 nmol/min.mg prot. en el paleoestriado y un máximo de 359 nmol/min.mg prot. en los lóbulos ópticos. Estos resultados son comparables a los de Enna y col. (1976) quienes utilizando un método radioquímico, encontraron valores de aproximadamente 400 nmol/min.mg de proteína, en un homogenato de cerebro total del pollo.

2.2. Influencia de la deprivación visual sobre los receptores muscarínicos y la actividad de AChE .

2.2.1. Fijación de $[^3\text{H}]$ -QNB en membranas de lóbulos ópticos de pollo.

En la figura 9 se graficaron los valores del antagonista radioactivo fijado específicamente, por mgr de proteína, para el LO ipsilateral (control) y para el deprivado contralateral. Puede observarse que, si bien los valores para el LO contralateral (LO_d), se mantienen por debajo de los

del LO ipsilateral, tomado como control (LO_c), las curvas resultan semejantes, tendiendo a converger a los 8 días del nacimiento y la deprivación, en que la concentración de sitios muscarínicos no resulta estadísticamente diferente (fig. 9).

A los 10 días hubo un pequeño aumento de la fijación en los dos LO, pero también sin diferencias significativas entre ellos.

Sorprende la variación de este parámetro en los tiempos estudiados, pero está correlacionado con el desarrollo de los RChM por LO (tabla 3) y también con los receptores nicotínicos estudiados por fijación de α -BuTx por otros autores (Wang y Schmidt, 1976). Por otra parte, como se puede observar en la tabla 4, también existe una correlación temporal con el desarrollo de la actividad de AChE.

En la tabla 3, pueden observarse los resultados de la fijación específica de $[^3H]$ -QNB, expresados por LO. Se consideró que ésta era la forma más adecuada para expresar los resultados, ya que la estructura se encuentra en una etapa de crecimiento y, si bien hay una tendencia a la disminución en el contenido proteico y en el peso húmedo de los LO_d en los tiempos más largos, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto a los controles.

Puede observarse que, a las 24 horas de la deprivación, hay un descenso en el número de sitios de unión del 16 %, que resulta significativo a las 48 horas, en que alcanza un 13 % de caída, 21 % a las 60 horas y 16 % a los 6 días. Aunque en la mayoría de los casos aún se observan diferencias al 8° día, éstas no fueron significativas. (Fig.11).

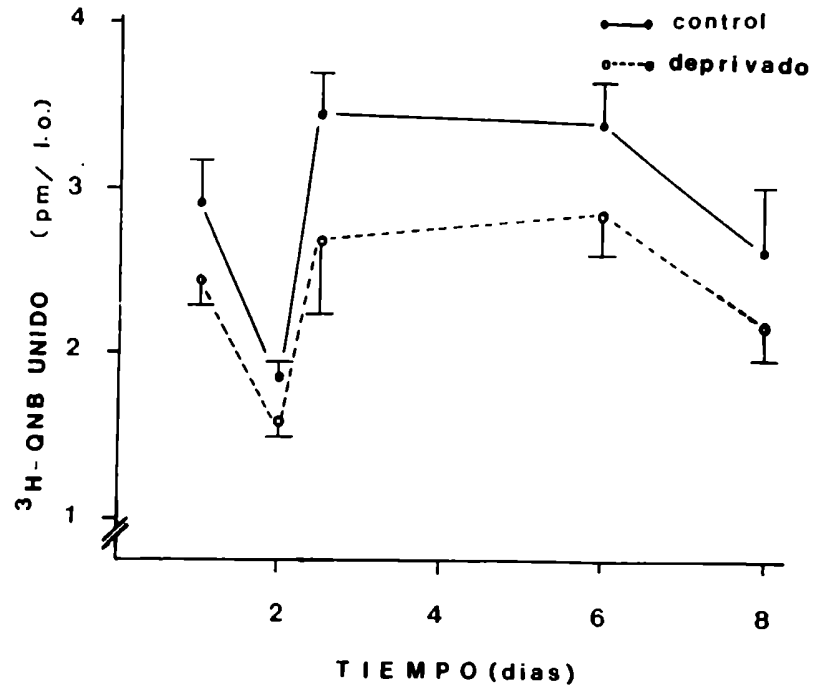


Figura 9: Sitios específicos para $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en membranas de LO de pollitos, en diferentes tiempos después de la eclosión.

—•— : datos para animales controles.

°---° : datos para animales con privación visual unilateral desde el nacimiento.

Ordenadas: picomoles por lóbulo óptico de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ unido.

Abcisas: días después de la eclosión (corresponde también a días de privación visual).

Cada punto es el valor medio de los resultados de 3 experimentos \pm ESM.

TABLA 3. Unión específica de [³H]-QNB en lóbulos ópticos de pollos con privación visual unilateral.

Edad (días)	Lóbulo óptico		Diferencia (%)	n	Test "t"
	Ipsilateral	Contralateral			
1	0.319 ± 0.023	0.267 ± 0.014	16	5	p < 0.02
2	0.249 ± 0.007	0.233 ± 0.008	6	9	NS
2.5	0.367 ± 0.017	0.327 ± 0.027	11	6	NS
6	0.348 ± 0.009	0.304 ± 0.024	13	8	NS
8	0.383 ± 0.010	0.372 ± 0.019	3	3	NS
10	0.371 ± 0.008	0.361 ± 0.007	2.7	3	NS

Resultados: en pmoles/mg de protefina. Cada valor representa la media de n experimentos realizados por triplicado ± ESM.

Diferencia: en porcentaje respecto del LO ipsilateral.

Análisis estadístico por el test de "t" para datos apareados.

Lóbulo óptico: ipsilateral correspondería al control; contralateral correspondería al privado.

n: número de animales.

TABLA 4. Actividad de AChE en LO de pollos con deprivación visual unilateral.

Edad (días)	Lóbulo óptico		Diferencia (%)	n	Test "t"
	Ipsilateral	Contralateral			
1	0.286 ± 0.010	0.197 ± 0.018	31	5	p < 0.001
2	0.236 ± 0.007	0.138 ± 0.002	42	9	p < 0.01
2.5	0.399 ± 0.008	0.261 ± 0.003	23	6	p < 0.05
6	0.270 ± 0.013	0.218 ± 0.007	19	8	NS
8	0.566 ± 0.019	0.580 ± 0.043	2.5	3	NS
10	0.520 ± 0.034	0.527 ± 0.023	(-1.3)	3	NS

Resultados: en pmoles/minuto por mg de protefna. Cada valor representa la media de n experimentos realizados por triplicado ± ESM.

Lóbulo óptico: ipsilateral correspondería al control; contralateral correspondería al privado.

Diferencia: en porcentaje respecto del LO ipsilateral.

n: número de animales.

Análisis estadístico por el test de "t" para datos apareados.

2.2.2. Actividad de AChE en membranas de lóbulos ópticos de pollo.

Con respecto a la actividad de AChE, en la tabla 4 se expresan los valores obtenidos en μmoles de ATC degradada por minuto y por miligramo de proteína, para el LO ipsilateral tomado como control y para el LO contralateral, considerado como deprivado. Las diferencias resultaron significativas hasta las 60 horas de desarrollo postnatal, en el sentido de una disminución de la actividad en el LO_d.

La caída en la actividad de AChE es más precoz y más notable que la caída en los sitios muscarínicos, luego de la deprivación. A las 24 horas la actividad había disminuído un 32 %, a las 48 horas, 42 % y a las 60 horas era 24 % menor que la de los controles (figs. 10 y 11).

Aunque a los 8 días las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, todavía se observaron valores menores en la mayor parte de los animales estudiados.

2.2.3. Discusión de los resultados obtenidos en los estudios sobre deprivación visual.

En 1978, Bondy y col. observaron una caída significativa en la actividad de AChE del LO del pollo a los 17 días de la enucleación.

Posteriormente, Por y Bondy (1982) observaron que durante la sinaptogénesis no hubo predominio de un tipo de neuroreceptor determinado en cuanto al orden de aparición en el "tectum opticus" del pollo, entre los días 10° y 16° del desarrollo embrionario. Sus resultados concuerdan con los de otros autores, con respecto a los receptores nicotí-

nicos, muscarínicos y serotoninérgicos (Kouvelas y Greene, 1976; Wang y Schmidt, 1976; Kouvelas 1980).

Por y Bondy (1982), deaferentando unilateralmente lóbulos ópticos de pollitos de un día de vida, observaron un aumento en la fijación específica de $[^3\text{H}]$ -QNB a los 21 días; atribuyeron este incremento a un fenómeno de supersensibilidad por denervación, aun cuando en el tiempo considerado encontraron una caída significativa en el contenido de proteínas del lóbulo óptico deaferentado.

También Francis y col. (1980) observaron un aumento tardío en la fijación del antagonista muscarínico en el LO, luego de la deaferentación, pero no detectaron cambios en los primeros días posteriores a la lesión, mientras que sí hubo pérdidas significativas de los receptores nicotínicos. Sin embargo debe tenerse en cuenta que en las condiciones de sus experimentos, hubo una considerable fijación inespecífica del ligando radioactivo y un mayor error estándar, respecto de los ensayos aquí presentados; estos hechos pueden haber enmascarado pequeños cambios más precoces.

Además debe considerarse la diferencia en el diseño experimental: mientras en los trabajos en que se practica la deaferentación se está destruyendo la vía, con la consiguiente interrupción en la transmisión y la posterior degeneración de las fibras, aquí sólo se ha modificado funcionalmente dicha vía por impedimento de la llegada de la estimulación específica.

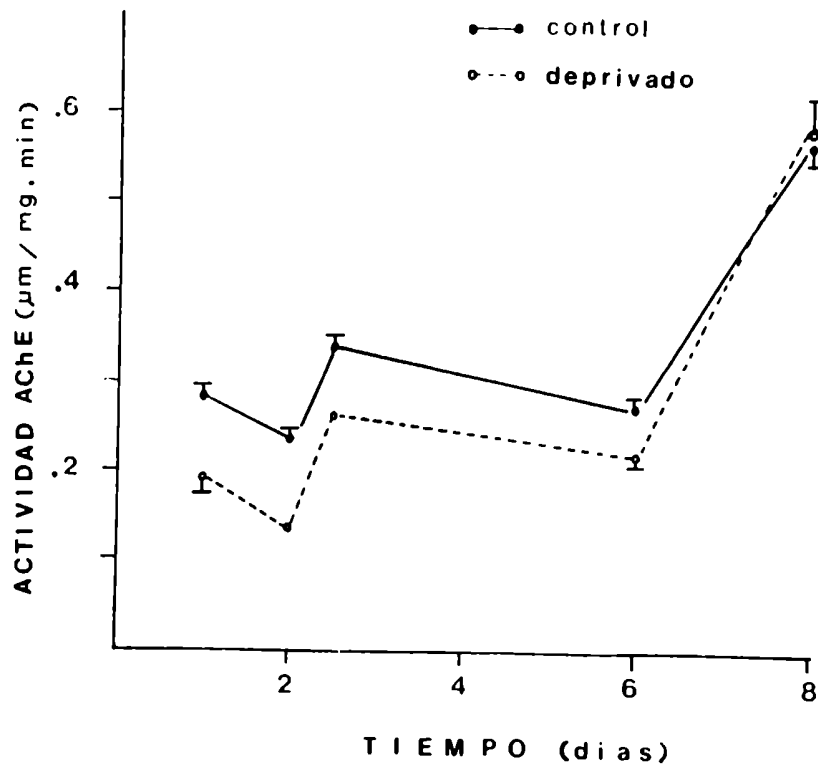


Figura 10: Actividad de AChE en membranas de LO de pollitos, en diferentes tiempos después de la eclosión.

.——. : datos para animales controles.

o-----o : datos para animales con deprivación visual unilateral desde el nacimiento.

Ordenadas: micromoles de ATC degradada por mg de proteína y por minuto.

Abscisas: días después de la eclosión (corresponde también a días de deprivación visual).

Cada punto es el valor medio de 3 experimentos \pm ESM.

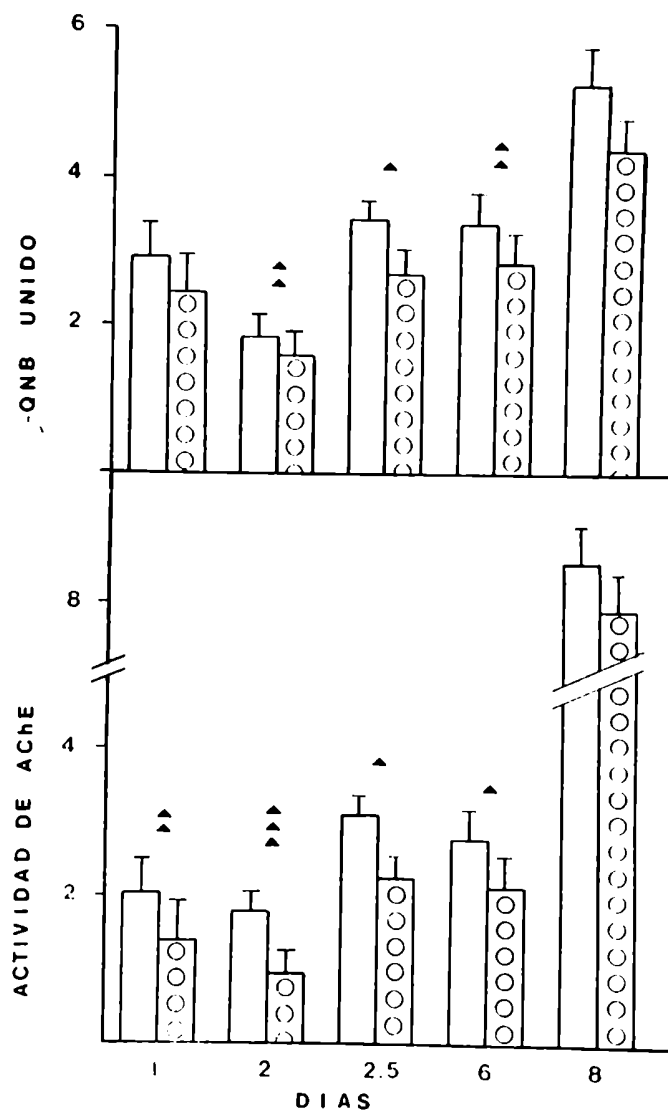


Figura 11: Unión específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ (pmol/LO) en el diagrama superior y actividad de AChE ($\mu\text{mol}/\text{min.LO}$) en el diagrama inferior, correspondientes a los lóbulos ópticos de pollitos controles \square y con deprivación visual unilateral $\square\square\square\square$.

Cada barra representa el valor medio de los experimentos indicados en las tablas 3 y 4 \pm ESM.

Análisis estadístico: test de "t" para datos apareados.

▲ $p < 0.05$; ▲▲ $p < 0.02$; ▲▲▲ $p < 0.01$.

Aunque aquí no se ha profundizado en el compromiso que pueda tener el sistema colinérgico en las vías visuales de los Mamíferos, es interesante poner de relieve que algunos investigadores consideran la posibilidad de que la ACh se encuentre involucrada, al menos como modulador, en la corteza visual. Shaw y col. (1984) han observado la inversión de la disposición laminar de los receptores colinérgicos muscarínicos en la corteza visual del gato, durante el período definido como crítico, desde el punto de vista fisiológico. Otros autores han señalado que el pico de actividad de ChAT ocurre alrededor de igual período, durante el desarrollo (Potemka y col., 1979).

Estudios realizados en corteza de rata sugieren que también ocurren cambios en la distribución de los RChM y en la actividad de las enzimas relacionadas con el sistema colinérgico, durante el desarrollo del sistema visual (Rotter y col., 1979 a y b; Wamsley y col., 1980; Kristt y Kasper, 1983).

Es posible que la deprivación visual unilateral de pollitos recién nacidos accione sobre el desarrollo postnatal de los RChM y de la AChE, debido a que se trate, tal vez, de un período especialmente crítico.

2.3. Localización de RChM y AChE en el hipocampo de rata.

El diseño experimental utilizado (sección 2.3 del capítulo II) consistió fundamentalmente en conseguir una destrucción significativa de los cuerpos neuronales en el hipocampo, con el objetivo de lograr disminuir notablemente la

cantidad de RChM considerados postsinápticos (Yamamura y Snyder, 1974b; Sábato y col., 1981). A la vez se debían conservar intactas las fibras de paso y los terminales nerviosos de las aferencias a dicha estructura. Por ello se utilizó el ácido kaínico (AK) inyectado intraventricularmente en dosis pequeñas. De este modo se podrían tal vez, poner en evidencia RChM localizados en la región presináptica.

Resulta necesario implementar éste y otros tipos de diseños experimentales, desde el momento en que no han podido hallarse, hasta el presente, diferencias farmacológicas entre los RChM presinápticos centrales y los postsinápticos, tanto centrales como periféricos (Bowen y Marek, 1982), desde que Iversen postulara su existencia en 1974.

2.3.1. Histología de la formación hipocámpica de ratas inyectadas intraventricularmente con AK.

Los animales inyectados intraventricularmente con AK, sufrieron la destrucción de las neuronas piramidales de las subregiones CA 3 a y b, en ambos hipocampos.

La figura 12 corresponde a una microfotografía al microscopio óptico, de una sección histológica de dicha región, teñida con violeta de cresilo. Como puede observarse, las subregiones CA 3 a y b están desprovistas de neuronas piramidales, presentando una moderada reacción de gliosis.

Las neuronas piramidales, granos y demás células de otras regiones de la formación hipocámpica, incluyendo la fascia dentada, no parecen afectarse.

Ocasionalmente se observó alguna leve pérdida neuronal en regiones profundas del neocortex.

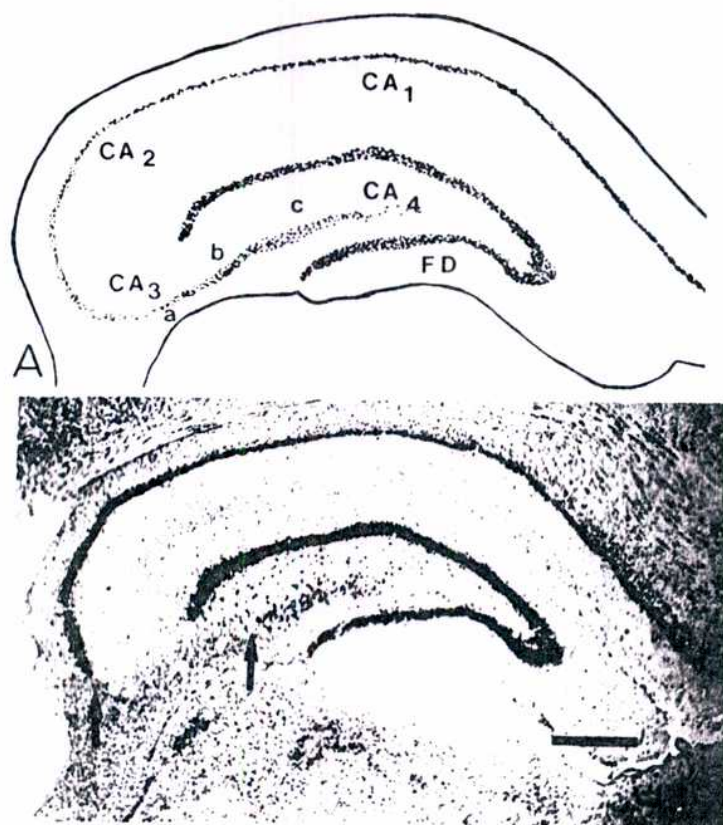


Figura 12: Sección coronal a través de la formación hipocámpica dorsal (FH).

Arriba: esquema de las subdivisiones de la FH. FD: fascia dentata; a, b, c: subáreas de CA 3.

Abajo: corte histológico teñido con violeta de cre-silo, obtenido 30 días después de inyección intraven-tricular de 0.5 μ g de AK. La región indicada entre flechas corresponde a CA 3 a y b, que presentan una notable destrucción de las células piramidales.

La barra a la izquierda corresponde a 0.5 mm.

2.3.2. Fijación de [^3H]QNB y actividad de AChE en membranas de hipocampos de ratas inyectadas con AK.

En la tabla 5 pueden observarse los resultados de la fijación específica de [^3H]QNB, expresados por gramo de tejido, por gramo de proteína y por hipocampo entero. La disminución en la fijación del ligando radioactivo, resultó estadísticamente significativa en las ratas inyectadas con AK ($p < 0.001$). En la mayor parte de los casos los ensayos se realizaron con una concentración del antagonista muscarínico de 500 pM; en esas condiciones puede considerarse que la fijación del ligando es máxima.

Como puede observarse en la tabla 5, mientras en los hipocampos de los animales controles hubo una fijación específica de 858 ± 37.4 pmol/g de proteína, en las ratas tratadas hubo 541 ± 42.2 pmol/g de proteína, lo que corresponde a una disminución del 37 %. Dicha reducción resulta aún mayor si los resultados se expresan por hipocampo entero, alcanzando un 43 %.

Si se compara el contenido proteico de los hipocampos controles con el de los hipocampos de los animales tratados con AK, puede observarse que hubo una disminución, aunque no resultó estadísticamente significativa.

La actividad de AChE resultó semejante en los controles ($98 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{g}$ de proteína) y en los animales tratados con AK ($95 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{g}$ de proteína), como se puede observar en la tabla 7.

Se hicieron ensayos para obtener las correspondientes curvas de saturación, en los hipocampos tratados y controles; los resultados se analizaron por la ecuación de Scatchard.

TABLA 5. Sitios muscarínicos en el hipocampo de ratas con inyección intraventricular de AK.

	<u>Proteína (mg)</u> hipocampo	pmol/g de proteína	pmol/g de tejido	<u>pmol</u> hipocampo
Control	6.88 ± 0.36	858 ± 37.4	111 ± 3.9	6.6 ± 0.3
Acido Kaínico	5.9 ± 0.44	541 ± 42.2 *	69 ± 6.5 *	3.7 ± 0.3 *
Porcentaje del control	85.7	63	62	56

Resultados: representan Bmáx. expresada en pmol de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ unido específicamente +

ESM. Cada experimento fue hecho por triplicado y se realizaron 16 distintos ensayos.

n: número de animales = 16.

Análisis estadístico por el test de "t" para muestras independientes. * $p < 0.001$.

En los controles se obtuvo una K_D de 44.9 ± 3.3 pM, con un único tipo de sitios de unión, como se pudo concluir de la confrontación de los datos experimentales con un modelo para simulación en computadora, con el objeto de obtener un ajuste óptimo del número de sitios (Aguilar y col., 1982).

En las ratas tratadas con AK, la K_D fue de 52.5 ± 7.9 pM, también con un único tipo de sitios de unión, de acuerdo con los métodos utilizados para el análisis de los datos experimentales.

2.3.3. Fijación específica de $[^3H]$ -QNB y actividad de AChE en membranas de hipocampos de ratas inyectadas con AK y con posterior sección de la fimbria-fórnix.

En la tabla 6 se muestran los resultados correspondientes a las membranas de hipocampos de animales tratados con AK a los que se les practicó la sección de la fimbria-fórnix. Si bien hubo una pequeña caída en el contenido proteico, no fue estadísticamente significativa respecto a los animales tratados con AK solamente. Tampoco hubo diferencias significativas en la unión específica de $[^3H]$ -QNB por gramo de proteína con respecto a los hipocampos de dichos animales, aunque sí las hubo respecto de los controles.

Cuando se expresan los resultados por hipocampo entero, sí se evidencia una caída estadísticamente significativa del 22 % en el número máximo de sitios de unión, con respecto a los animales que fueron lesionados sólo con AK (fig. 13).

El análisis de las curvas de saturación por la ecuación de Scatchard, tampoco arrojó diferencias en las K_D de estos hipocampos, respecto de los controles.

TABLA 6. Sitios muscarínicos en el hipocampo de ratas con inyección intraventricular de AK y posterior sección unilateral de la fimbria-fórnix.

	<u>Proteína (mg)</u> hipocampo	pmol/g de proteína	pmol/g de tejido	<u>pmol</u> hipocampo
Control (AK)	4.75 ± 0.4	669 ± 49	66 ± 3.35	3.16 ± 0.22
Lesionado (AK + sección)	5.54 ± 0.28	556 ± 35 *	60.5 ± 4.49	2.9 ± 0.24
Porcentaje del control	116.6	83	91.6	91.7

Resultados: son el valor promedio de los Bmáx. obtenidos en nueve experimentos ± ESM.

Cada ensayo fue hecho por triplicado.

n: número de animales = 9.

Control: se refiere al lado que sólo recibió AK pero no sufrió la sección de la fimbria.

Lesionado: se refiere al lado que recibió AK y posterior sección de la fimbria.

Análisis estadístico por el test de "t" para muestras apareadas. * p < 0.005.

TABLA 7. Actividad de AChE en hipocampos de rata, luego de a) sección de la fimbria-fornix y b) de inyección intraventricular con AK y posterior sección.

	n	umol/min.g protefina	% del control
a)			
Control	5	87 ± 5.4	100
3 días de sección	5	55 ± 4.8	63 *
b)			
Control	6	98 ± 5.1	100
AK	6	95 ± 5.7	97
AK + sección	6	56 ± 4.9	57 *

n: número de animales.

Análisis estadístico por el test de "t". * p < 0.01.

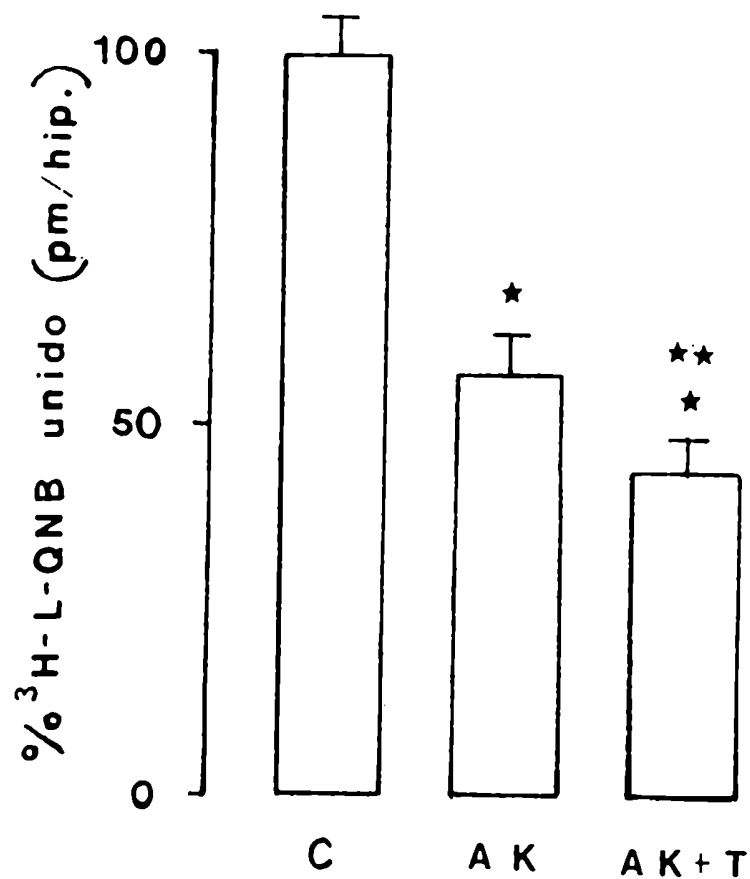


Figura 13: [³H]-QNB unido específicamente por hipocampo, expresado en porcentajes del valor medio de los datos obtenidos de los animales controles.

C: controles; AK: tratados con AK; AK + T: tratados con AK y posterior sección de la fimbria-fornix.

Cada barra corresponde al valor promedio de por lo menos 5 experimentos.

Análisis estadístico por el test de "t" para muestras independientes. AK con respecto a C: ★ $p < 0.001$; AK + T con respecto a AK: ★★ $p < 0.05$.

La actividad de AChE en los hipocampos de los animales inyectados con AK fue de 95 $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ de proteína, mientras que en los que sufrieron además la sección de la fimbria, fue de 56 $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ de proteína, lo que representa una disminución de alrededor del 41 %. Estos resultados están en concordancia con la caída del 37 % en la actividad de AChE, en los animales en que sólo se practicó la transección de la fimbria. (Tabla 7).

2.3.4. Discusión de los resultados obtenidos acerca de la localización de los receptores colinérgicos muscarínicos y de la actividad de AChE en el hipocampo.

Ya en 1974, Yamamura y Snyder estudiaron los receptores muscarínicos en el hipocampo, luego de lesionar las aferencias colinérgicas; como no observaron cambios, concluyeron que dichos receptores están localizados en la postsinapsis.

Overstreet y col. (1980) no observaron modificaciones en los sitios muscarínicos ni benzodiazepínicos del hipocampo de la rata, luego de lesionar el septum. Sin embargo, Sábato y col. (1981) comprobaron que luego de seccionar la fimbria-fórnix se produce una disminución y luego un aumento en los receptores benzodiazepínicos, sin cambios en la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$. Estos resultados negativos indujeron a pensar que los RChM del hipocampo tienen una localización postsináptica predominante.

Parecía adecuado encontrar un modo de destruir neuronas hipocámpicas, sin dañar las fibras y terminales nerviosas, como un camino para corroborar dicha hipótesis. Con este objeti-

vo se investigó el efecto neurotóxico del ácido kaínico (AK), el cual, como ya se mencionó en la Introducción (2.4), ejerce una acción destructiva sobre las neuronas piramidales de ciertas subregiones de la formación hipocámpica, en forma selectiva (Nadler y col., 1978).

Los animales fueron sacrificados a los treinta días de la inyección intraventricular de AK, ya que las membranas de las neuronas en degeneración pueden persistir en períodos más cortos (Olney y De Gubareff, 1978).

A las dosis utilizadas, el AK destruyó selectivamente las subáreas CA3 a y b, confirmando los resultados de Nadler y col. (1978).

En los hipocampos así lesionados hubo una disminución del 37 % en la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ expresada por gramo de proteína y del 43 %, si se expresa en relación a toda la formación hipocámpica, sin cambios apreciables en la afinidad del ligando por el receptor (Fig 13).

Esta considerable reducción en el número máximo de sitios muscarínicos es realmente sorprendente si se tiene en cuenta que la lesión estuvo limitada a las subáreas CA3 a y b, las que representan una pequeña proporción de las neuronas piramidales y demás neuronas presentes en la formación hipocámpica.

Estos hallazgos concuerdan con las observaciones previas neuroanatómicas, radioautográficas y bioquímicas, acerca de la localización, preferencialmente postsináptica de los receptores en cuestión (Kuhar y Yamamura, 1976; Rotter y col. , 1979) y de las terminales colinérgicas de la vía septo-hipocámpica, en subáreas de la capa de las células

piramidales (Fonnum, 1970; Mosko y col.,1973).

Como las fibras septo-hipocámpicas no sufren el efecto destructor del AK, estos hallazgos confirman la localización postsináptica de los receptores muscarínicos (Kuhar y Yamamura, 1976; Sábato y col.,1981; Overstreet y col.,1980).

Sin embargo, los resultados observados luego de la sección de la fimbria-fornix, en los animales que habían recibido la inyección intraventricular de AK, no se ajustan a la misma interpretación.

Como el AK produce una cierta reacción de gliosis en la región, la expresión más adecuada de los resultados parece ser aquella en relación con toda la estructura (Nagy y col., 1978). En este caso, si se comparan las ratas tratadas con AK ($B_{\text{máx}} = 3.7 \pm 0.3$ pmol/hipocampo) con aquellas en que se seccionó la fimbria ($B_{\text{máx}} = 2.9 \pm 0.2$ pmol/hipocampo), las diferencias en la unión específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ resultan estadísticamente significativas (Tabla 6; Fig 13).

La disminución en el número de receptores luego de la sección de la fimbria-fornix, estaría en contradicción con los resultados obtenidos por Sábato y col.(1981), que no observaron cambios en la fijación de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$, a los dos y catorce días posteriores a la deaferentación colinérgica del hipocampo.

Esta diferencia podría explicarse por la gran reducción del número de receptores debida al AK, lo que podría favorecer la detección de un pequeño nuevo decremento luego de la deaferentación colinérgica, atribuible a RCh^{M} presinápticos. Esta interpretación resulta coherente con la autorregulación de la

liberación de ACh en el hipocampo, así como en la corteza y en el estriado (Hadrhazy y Szerb, 1977; Marchi y col., 1981).

Paralelamente, la actividad de AChE resulta disminuída en una proporción semejante, tanto después de la deaferentación colinérgica, como luego de la inyección de AK y posterior deaferentación. Es decir que parece independiente, al menos en las condiciones de estos experimentos, de la neurona postsináptica.

2.4. Localización de RChM y actividad de AChE en el neocortex.

Teniendo en cuenta la posibilidad de que la principal aferencia colinérgica al neocortex corresponda a las fibras provenientes del nBM, en los experimentos realizados se intentó producir la deaferentación colinérgica de la corteza, por lesiones electrolíticas extensas de dicho núcleo.

Se estudió la fijación de $[^3\text{H}]\text{QNB}$ y la actividad de AChE, en una fracción cruda de membranas del neocortex.

Se tuvo especial cuidado en los tiempos seleccionados para realizar los experimentos, de modo de poder seguir los posibles cambios en los parámetros analizados.

Como ya se mencionó en este mismo capítulo, en la sección 2.3, se hizo necesario implementar este tipo de diseño experimental, debido a que no se han establecido claras diferencias farmacológicas que discriminen entre los receptores colinérgicos muscarínicos presinápticos y postsinápticos (Bowen y Marek, 1982).

A 7020

A 6790

A 6670

A 6360

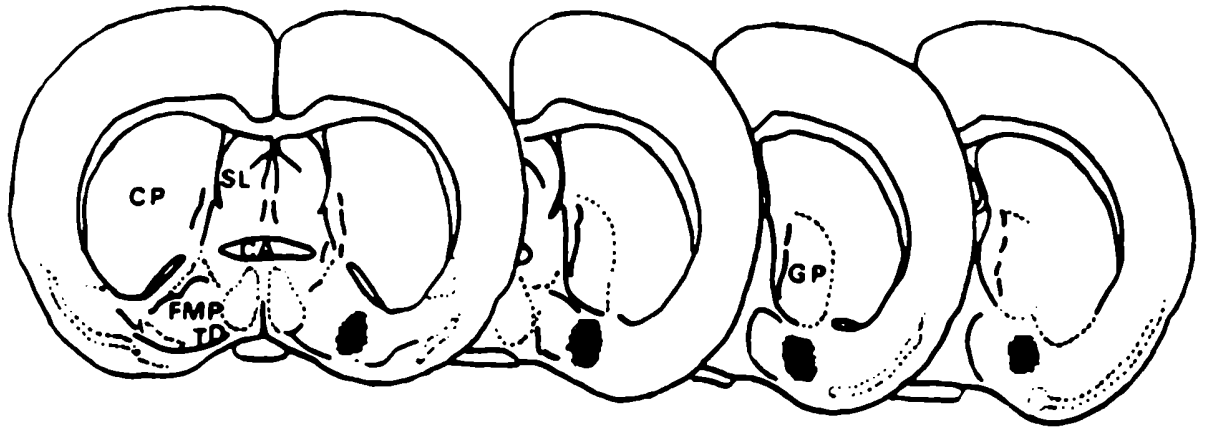


Figura 14: Esquemas de secciones coronales de cerebro de ratas con lesión del nBM izquierdo. CA: comisura anterior; CP: núcleo caudado-putamen; GP: globo pálido; FMP: fascículo medial del prosencéfalo; SL: núcleo septal lateral; TD: tracto diagonal.

2.4.1. Extensión de las lesiones electrolíticas del nBM.

En la figura 14 se muestran esquemas de secciones coronales del cerebro de ratas seleccionadas al azar del grupo en cuestión. Se señala la extensión de las lesiones producidas.

Si bien el tamaño de la lesión varió levemente, en ningún caso incluyó el globo pálido (GP) ni otras estructuras vecinas, estando confinada al área en la cual están ubicadas las neuronas magnocelulares del nBM.

2.4.2. Fijación específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en la corteza cerebral de ratas con lesión del nBM.

En la tabla 8.a, se dan los resultados de la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ a la fracción cruda de membranas de corteza cerebral. Como puede observarse, no se encontraron diferencias significativas en el número máximo de sitios de unión ($B_{\text{máx}}$) entre las cortezas de ambos hemisferios, tanto en los animales controles, como en aquéllos con operación simulada; asimismo no hubo diferencias significativas entre ambos grupos de animales.

Tres días después de la lesión unilateral del nBM, se observó una disminución significativa del 25.8 % en el $B_{\text{máx}}$, en las membranas correspondientes a la hemicorteza ipsilateral con respecto a los valores controles.

En la hemicorteza contralateral también hubo una disminución significativa, pero de menor magnitud (18.8 %), respecto de los controles.

El $B_{\text{máx}}$ obtenido para las hemicortezas contralaterales, fue significativamente distinto del obtenido para las hemicor-

tezas ipsilaterales, analizados los resultados por el test de " t " para datos apareados.

Luego de catorce días de la lesión, se obtuvieron valores para la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ semejantes a los de los controles, tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral. Si bien en ambas hemicortezas los valores fueron algo superiores a los de los controles, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (fig. 15).

2.4.3. Actividad de AChE en corteza cerebral de ratas con lesión del nBM.

Los resultados anteriores adquieren particular interés cuando se los confronta con la actividad de AChE en los mismos animales. (Ver tabla 8.b). También en la actividad de dicha enzima, la lesión produjo una disminución significativa en la hemicorteza ipsilateral, que llegó a ser del 53 %. En la hemicorteza contralateral la reducción fue del 43.7 %.

En los animales sacrificados a los catorce días de la lesión unilateral del nBM, la actividad de la AChE cortical permaneció notablemente disminuída en ambos hemisferios, manteniéndose prácticamente en los mismos valores que en los animales estudiados a los tres días de la lesión (fig. 15).

2.4.4. Discusión de los resultados obtenidos acerca de la localización de los RChM y de la actividad de AChE en la corteza cerebral.

Hasta el momento en que se finalizó este trabajo, no había datos en la bibliografía sobre la reducción de RChM cor-

tales, luego de lesiones de distintas supuestas aferencias colinérgicas. Por esa época, McKinney y Coyle (1982) encontraron una reducción del 14 % en los sitios muscarínicos a los tres días de la lesión del nBM, producida por inyección de ácido kaínico (AK).

Los resultados obtenidos están en concordancia con los datos de la bibliografía, en el sentido de postular a las neuronas magnocelulares del nBM como el lugar de origen de la mayor aferencia colinérgica al neocortex. (Johnston y col., 1979; Lehmann y col., 1980; Wenk y col., 1980).

La disminución en la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (25.8 %) en la corteza ipsilateral, observada a los tres días de la lesión del nBM, permite sugerir que este decremento se debe a degeneración de los terminales presinápticos, es decir a desaparición de receptores presinápticos ubicados en dichos terminales originados en el nBM.

Esta interpretación parece corroborada por el hecho de que la actividad de AChE cortical también disminuyó durante el mismo período.

A los catorce días de la lesión, aparece una clara discrepancia entre los dos parámetros estudiados: mientras que la actividad de AChE permanece disminuída, la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{QNB}$ está nuevamente en valores muy próximos a los de los animales controles o con operación simulada (tabla 8.a y 8.b). Los niveles de $B_{\text{máx}}$ alcanzados se encuentran algo por encima de los datos controles, pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

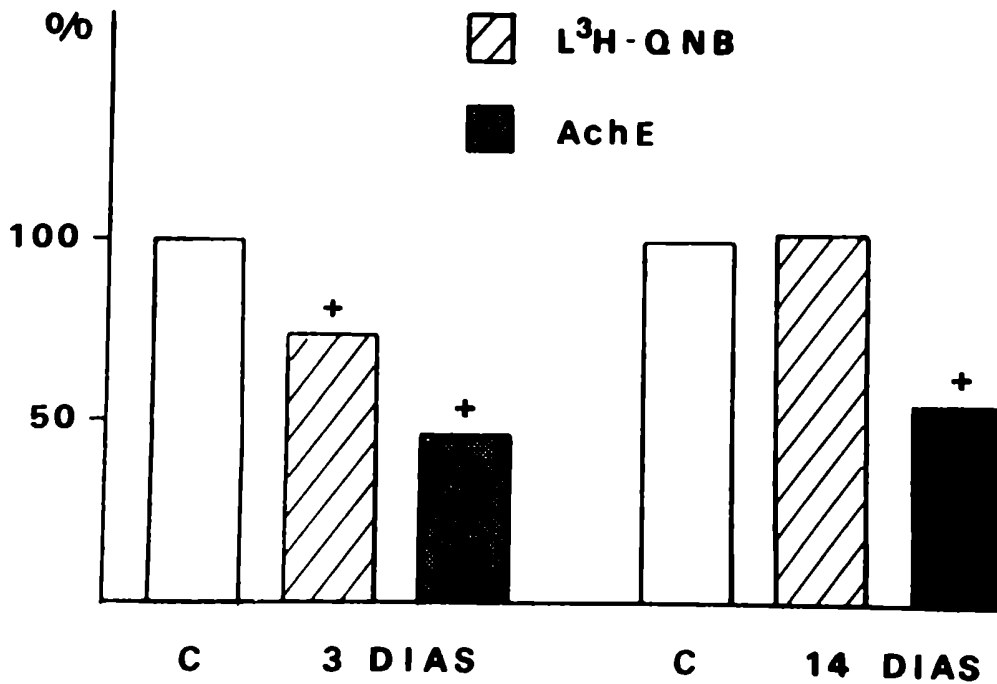


Figura 15: Fijación específica de [³H]-QNB y actividad de AChE en membranas de corteza cerebral de ratas con lesión del nBM, luego de 3 o de 14 días respectivamente. Cada barra representa el valor medio de por lo menos 6 experimentos, expresados en porcentajes de los valores controles.

Análisis estadístico explicitado en las tablas 8.a y 8.b.

TABLA 8 a. Unión específica de [³H]-QNB en membranas de corteza cerebral de ratas con lesión unilateral del nBM.

	Corteza ipsilateral	Porcentaje del control	Corteza contralateral	Porcentaje del control	n
Control	829.4 ± 27.3	100	817.8 ± 26.8	100	14
Operación simulada	818.7 ± 24.5	98.7	851.7 ± 33.2	104.1	7
Lesionadas de 3 días	615.5 ± 24.9 *	74.2	664 ± 18.1 **	81.2	6
Lesionadas de 14 días	844 ± 43.5 #	101.7	896.8 ± 58.1 ##	109.6	6

Resultados: representan el número máximo de sitios de unión específica para [³H]-QNB, expresados en pmoles/g de proteína ± ESM.

n: número de animales.

* p < 0.001 con respecto a los valores de los controles y los de operación simulada.

** p < 0.005 " de corteza ipsilateral.

p < 0.001 " de lesionadas de tres días.

p < 0.01

TABLA 8 b. Actividad de AChE en membranas de corteza cerebral de ratas con lesión unilateral del nBM.

	Corteza ipsilateral	Porcentaje del control	Corteza contralateral	Porcentaje del control	n
Control	102 ± 4	100	103 ± 4	100	11
Operación simulada	102 ± 5	100	96 ± 5	93	7
Lesionadas de 3 días	48 ± 6 *	47	58 ± 7 *	56.3	6
Lesionadas de 14 días	56 ± 6 *	54.9	58 ± 9 *	56.3	6

Resultados: representan los picomoles de acetilcolina degradada, por minuto y por gramo de proteína ± ESM.

n: número de animales.

* p < 0.001 con respecto al control y a las ratas con operación simulada.

Una explicación posible para estos hallazgos es la de considerar que el número de receptores postsinápticos podría estar aumentado, como consecuencia de la deaferentación de la neurona postsináptica, ocultando así la reducción atribuida a la desaparición de los receptores presinápticos.

La disminución en la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{QNB}$ observada en la corteza contralateral a la lesión, luego de tres días (tabla 8.a), así como la disminución en la actividad de AChE a los tres y catorce días de la lesión (tabla 8.b), estarían avalando la hipótesis que postula cierto grado de inervación contralateral, en este caso proveniente de las neuronas del nBM lesionado; estos resultados concuerdan con los estudios del nBM realizados con HRP (Divac, 1975; Lehmann y col., 1980; Wenk y col., 1980).

2.5. Efectos de una condición estresante sobre los RChM en distintas regiones del sistema nervioso central.

En un intento por comenzar a estudiar la regulación de los RChM "in vivo", en condiciones fisiológicas, se seleccionó un modelo de estrés en condiciones que resultaran ineludibles para el animal en cuestión, ya que hay datos bibliográficos en el sentido de un aumento en los niveles de ACh cerebrales en condiciones severas de estrés. (Karczmar y col., 1973; Saito y col., 1976).

A la vez, estos experimentos involucraron el análisis previo de diversas regiones del Sistema Nervioso central en ratas normales.

2.5.1. Fijación de [^3H]-QNB en membranas de corteza cerebral, ganglios basales y cerebelo de ratas sometidas a natiación forzada en agua a 18°C.

De todas las áreas del SNC estudiadas, sólo algunas mostraron cambios netos en los RChM la corteza cerebral, los ganglios basales y el cerebelo.

La tabla 9 muestra los resultados obtenidos en corteza cerebral y ganglios basales en los diferentes tiempos analizados: en la parte superior están los datos correspondientes a B_{máx} de los animales controles, luego siguen los correspondientes a los estresados y sacrificados inmediatamente (15 min), los sacrificados a los 60 minutos de comenzado el tratamiento y, por último, los datos de animales que vivieron 24 horas luego del estrés, tiempo en que fueron decapitados.

Como puede observarse, inmediatamente después de finalizado el tratamiento (15 min), hubo una disminución estadísticamente significativa en la fijación específica del ligando [^3H]-QNB a las membranas de corteza cerebral, que alcanzó un 27 % respecto de los valores controles. Dicho cambio se revirtió, llegando a valores semejantes a los de los controles a los 60 minutos.

También hubo una disminución en el número máximo de sitios específicos de unión de [^3H]-QNB en los ganglios basales (estriado y globo pálido) a los 15 minutos, pero no resultó estadísticamente significativa (fue de un 8 % respecto de los controles). A los 60 minutos la caída fue más pronunciada (alcanzó un 14 %) y significativa; luego de 24 horas, los valores del B_{máx} no se diferenciaron de los de los controles.

TABLA 9. Sitios de unión específica para [³H]-QNB en corteza cerebral y ganglios basales de rata, luego de un estímulo estresante.

Tiempo	Corteza cerebral		Ganglios basales	
	(pmol/g proteína) n	%	(pmol/g proteína) n	%
Control	1859 ± 101	13	1591 ± 48	13
15 min	1351 ± 79	12	1466 ± 62	9
60 min	1939 ± 176	3	1378 ± 63	5
24 horas	2108 ± 142	3	1554 ± 110	5

1
9
5
1

Resultados: corresponden al valor promedio de los Bmáx de n experimentos ± ESM.

Cada ensayo fue hecho por triplicado.

n: número de experimentos.

Análisis estadístico por el test de "t". *p < 0.001, **p < 0.02.

En la figura 16 se muestra una representación de acuerdo con la ecuación de Scatchard, correspondiente a los ganglios basales de una rata control y de otra sacrificada a los 60 min del tratamiento. Puede observarse que el $B_{\text{máx}}$ es, en el primer caso de 2031 pmol/g de proteína y, en el segundo, de 1461 pmol/g de proteína, mientras que la K_D es de 34 y 33 pM respectivamente.

Los cambios observados tanto en corteza cerebral como en ganglios basales, pueden ser atribuidos a una disminución en el número máximo de sitios de unión ($B_{\text{máx}}$), sin cambios en la afinidad estimada por la constante de disociación aparente (K_D).

Es muy diferente el panorama con respecto a la otra estructura que presentó variaciones: el cerebelo.

Como puede observarse en la figura 17, la representación de Scatchard para las membranas de cerebelo muestra un incremento definido en el $B_{\text{máx}}$ tanto a los 15 como a los 60 minutos, mientras que la K_D no presenta diferencias significativas (tabla 10).

En la figura 18 se representó el curso temporal de los cambios observados en la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ luego del tratamiento estresante, en la corteza cerebral (a), los ganglios basales (b) y el cerebelo (c). Los datos se graficaron en porcentajes respecto de los valores controles. En la última estructura considerada, el cerebelo, se evidencia que los cambios ocurrieron en sentido opuesto.

Debe tenerse en cuenta que en el cerebelo, el número

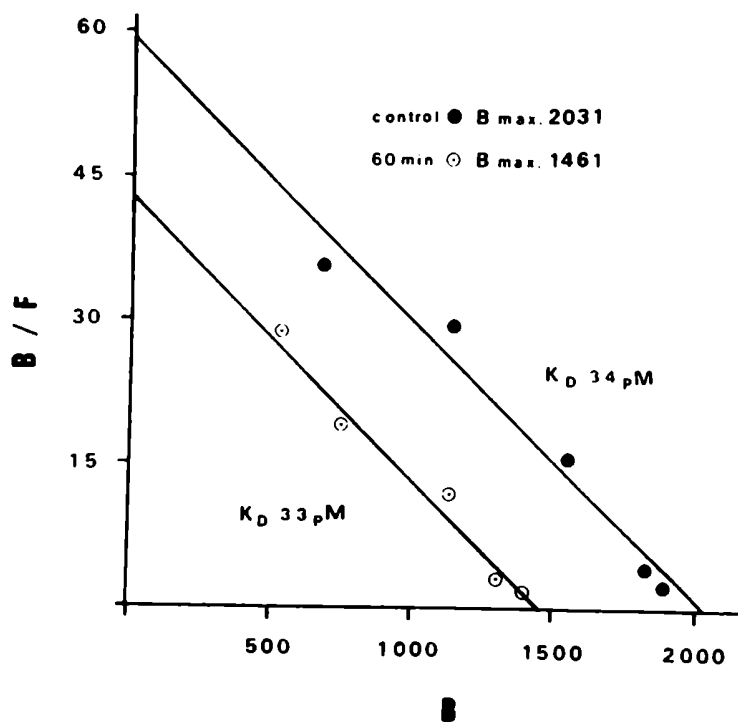


Figura 16: Gráfico de Scatchard de la unión específica de $[^3\text{H}]$ -QNB a membranas de ganglios basales (estriado + GP) de ratas controles ● y luego de 60 minutos de someterlas a un tratamiento estresante ○ .

Los puntos corresponden a los datos de un experimento. $B_{\text{máx}}$ está expresada en picomoles/gramo de proteína.

B: $[^3\text{H}]$ -QNB unido (pmol/g de proteína).

F: concentración de $[^3\text{H}]$ -QNB libre (pM).

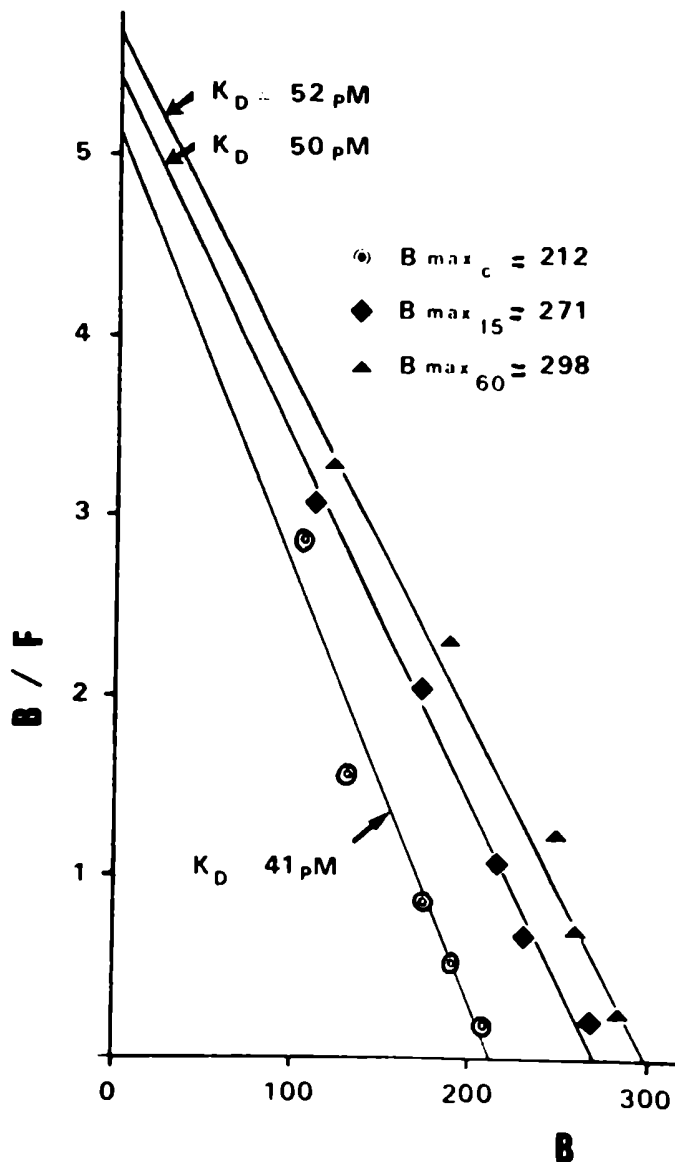


Figura 17: Gráfico de Scatchard de la unión específica de $[^3\text{H}]$ -QNB a membranas de cerebelo de ratas controles \odot ; 15 min después de un tratamiento estresante \blacklozenge y 60 min después del mismo tratamiento \blacktriangle . Los puntos corresponden a los datos de un experimento. $B_{m\acute{a}x.}$ está expresada en picomoles/g de proteína. B: $[^3\text{H}]$ -QNB unido (pmol/g de proteína). F: concentración de $[^3\text{H}]$ -QNB libre (pM).

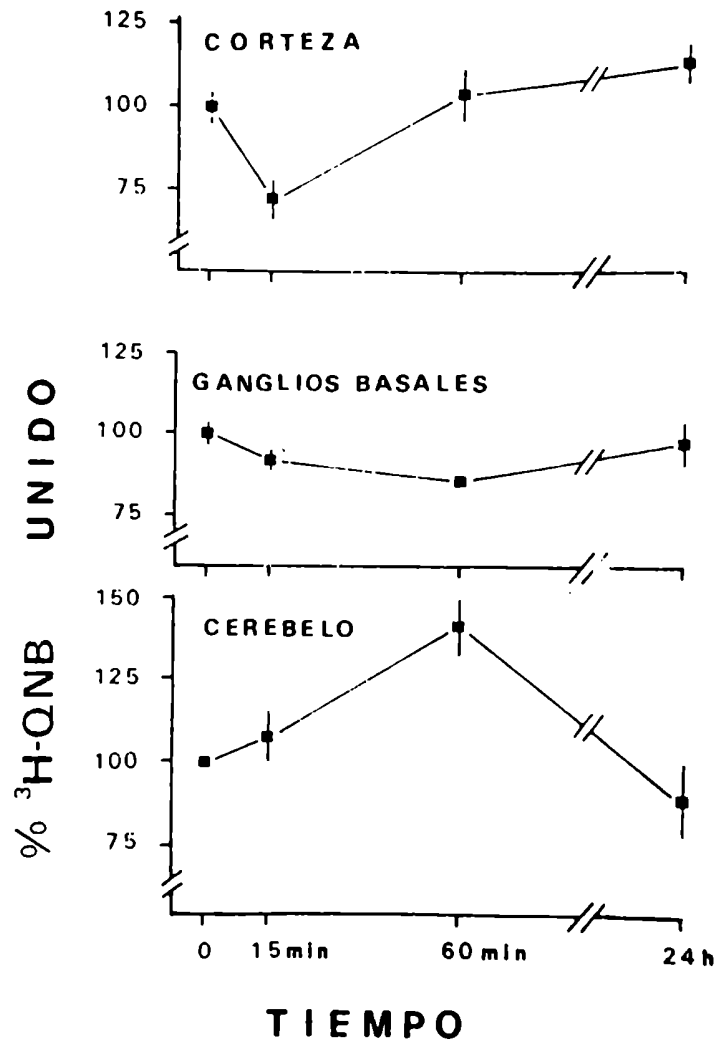


Figura 18: Unión específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ a membranas de corteza cerebral, ganglios basales y cerebelo de ratas sometidas a un tratamiento estresante.

Cada punto representa los $B_{\text{máx}}$. promedio de por lo menos 3 experimentos, expresados como porcentajes del valor medio de los controles.

Tiempo: corresponde a los minutos o a las 24 horas después del tratamiento estresante.

de sitios de fijación específicos para QNB es mucho menor que en las otras dos estructuras que presentaron cambios, estando el B_{máx} en el rango de 200 pmol/g de proteína; es decir que es diez veces menor que en la corteza cerebral (Tabla 9).

En los animales sacrificados a los 60 minutos del tratamiento se observó un incremento del B_{máx} del 41 %, mientras que a las 24 horas no se detectaron diferencias significativas respecto de los controles.

Paralelamente se realizaron ensayos en otras regiones del sistema nervioso en los mismos animales sometidos a estrés. No se observaron diferencias significativas a los 15 ni a los 60 minutos del tratamiento, en el número máximo de sitios de fijación específicos para $[^3\text{H}]$ -QNB, de hipocampo, bulbos olfatorios, amígdala, tálamo, hipotálamo y tallo cerebral (tabla 10).

2.5.2. Discusión de los resultados obtenidos acerca de los efectos de una condición estresante sobre los RChM en distintas regiones del sistema nervioso central.

Para provocar el estrés fue seleccionada una situación que resultara ineludible para el animal en cuestión y que fuera reproducible.

Otras situaciones que provocan estrés pero que permiten la huida o el evitamiento del estímulo por parte del animal, parecen posibilitar la adaptación rápida de los distintos parámetros neuroquímicos a los cambios del medio, manteniendo la homeostasis (Anisman, 1978). En la condición de estrés aquí utilizada, pareciera que tal adaptación no se produce, al menos en tiempos muy cortos (Karczmar y col., 1973).

TABLA 10. Sitios de unión específica para $[^3\text{H}]$ -ONB en diferentes regiones del SNC de la rata, luego de un estímulo estresante.

Regiones	Control (pmol/g proteína)	% de variación	
		15 min	60 min
Corteza cerebral	1859	73*	104
Ganglios basales	1591	92	86***
Cerebelo	215	108	141**
Bulbos olfatorios	1529	102	110
Amígdala	983	112	
Tálamo	910	109	
Hipotálamo	653	90	
Tallo cerebral	642	94	
Hipocampo	1808	90	96

Resultados: corresponden al valor promedio de los B_{máx} de por lo menos tres experimentos independientes.

Cada punto fue ensayado por triplicado.

Análisis estadístico por el test de "t". *p < 0.001, **p < 0.01, ***p < 0.02.

En este caso resultó relevante el tiempo en que se realizaron los experimentos en relación al tratamiento, ya que los cambios observados fueron precoces y revertidos dentro del primer día.

Saito y col. (1976) demostraron que en un entrenamiento de evitamiento de un estímulo nociceptivo, lo que implica cierto grado de estrés, no se alteró el contenido de NE, DA, 5-HT ni ACh en el SNC de la rata; pero la inmersión en agua fría disminuyó el contenido de NE y aumentó el de ACh cerebrales. Más aún, en una situación controlable, el estrés en general no afecta los niveles de ACh ni de corticosterona sérica; pero a medida que la severidad del estímulo aumenta, tienden a aumentar los niveles de ACh en el cerebro (Anisman, 1978).

Como se mencionó en la Introducción (Capítulo I; 2.6) los datos de la bibliografía se refieren en general al neurotransmisor ACh y sólo hay unos pocos trabajos en relación a receptores colinérgicos y estrés.

Gulati y col. (1982) no observaron cambios en los RChM de corteza cerebral de rata, luego de estrés agudo por aplicación de un shock electroconvulsivante. Sin embargo, la aplicación crónica del mismo tipo de estímulo produjo un incremento significativo de los sitios para $[^3\text{H}]\text{-QNB}$.

En otro diseño experimental, utilizando inmovilización crónica en una cepa de ratas muy sensibles al estrés, Gilad y col. (1983) observaron un aumento en el número máximo de sitios receptores muscarínicos del hipocampo; en una cepa menos sensible no se produjeron tales cambios. Sin embargo, la inmovilización por un corto período no afectó el nivel de RChM en ninguna de las dos cepas.

En el diseño experimental aquí utilizado, que representa una situación estresante aguda que no puede ser evitada por el animal, se produjeron cambios rápidos y reversibles en el número máximo de sitios muscarínicos en la corteza cerebral, los ganglios basales y el cerebelo.

Como puede observarse en la figura 18, los cambios en las tres estructuras del SNC siguieron un curso temporal diferente. Tanto en la corteza como en los ganglios basales hubo una disminución, pero de diferente intensidad, siendo más pronunciada en la corteza, así como más precoz. El cerebelo mostró un sentido inverso en las variaciones, que aparecieron algo más tardíamente.

Además dichos cambios fueron específicos, ya que no se observaron variaciones en los receptores adrenérgicos α_1 , α_2 y β ni en los dopaminérgicos, analizados en el mismo laboratorio. Los cambios que se produjeron en las mismas condiciones en los receptores para las benzodiazepinas, no ocurrieron en igual sentido en la misma estructura, observándose variaciones de dichos receptores en otras regiones del SNC (Medina y col., 1982; 1983).

CAPITULO IV.

DISCUSION FINAL Y CONCLUSIONES

1. DISCUSION Y CONCLUSIONES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE EXPERIMENTOS.

1.1. Desarrollo ontogenético de los RChM y de la actividad de AChE en el SNC del pollo.

La conclusión más general que se deriva de este estudio es que existe una considerable variación en la ontogénesis de los RChM y de la actividad de AChE en las distintas regiones estudiadas del SNC del pollo.

En el cerebro del pollo, la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos está dentro del mismo rango que la que se encuentra en el cerebro de los Mamíferos; en este último caso, el cerebelo también tiene los menores valores (Coyle y Yamamura, 1976; Yavin y Harel, 1979; East y Dutton, 1980).

El hallazgo más notable es la gran reducción postnatal en la concentración de RChM en el cerebelo, que en adulto sólo alcanza el 30 % de la del recién nacido, lo que podría atribuirse a dilución por aumento de otros materiales, como puede ser la mielina y/o a un cambio cualitativo en la población neuronal.

En los pollitos recién nacidos, la actividad de AChE tuvo el mínimo valor en el paleoestriado (0.149 umol/min/mg de proteína) y el máximo, en los lóbulos ópticos (0.350 umol/min/mg de proteína). Enna y col. (1976) utilizaron un método radioquímico y encontraron valores máximos de aproximadamente 0.4 umol/min/mg de proteína, en el cerebro total del pollo. Si bien hay diferencias, debidas tal vez a los distintos métodos y al material biológico empleados, los resultados son comparables.

Es importante tener en cuenta que la enzima en cuestión puede estar localizada tanto pre- como postsinápticamente y que, durante la ontogénesis, puede encontrarse actividad enzimática en células que luego la pierden (Silver, 1971; Lehmann y Fibiger, 1979).

En función de los resultados obtenidos se puede considerar que existe un cierto paralelismo entre la relación temporal de la ontogénesis de la actividad de AChE y de los RChM en las regiones estudiadas y en los tiempos considerados, excepto en el cerebelo. Sin embargo, el curso temporal y la velocidad de los cambios tienen características especiales en cada área.

El gran aumento en la actividad de AChE y en la fijación de [^3H]-QNB en los lóbulos ópticos, que tiene lugar entre el nacimiento y el día 12° de vida postnatal, sugiere la posibilidad de que la estimulación óptica o la experiencia visual estén involucradas en su desarrollo. Privando a los animales de estimulación visual, unilateralmente desde el nacimiento, se observaron notables cambios en dichos parámetros, que refuerzan dicha presunción.

1.2. Influencia de la deprivación visual sobre los receptores muscarínicos y la actividad de AChE en los lóbulos ópticos del pollo.

Hasta el presente no hay consenso acerca de los neurotransmisores que se encuentran en las células ganglionares retinianas y en sus axones que forman el nervio óptico (Oswald y Freeman, 1980).

La ACh ha sido sugerida como un candidato con altas probabilidades para ese rol en Vertebrados no Mamíferos (Freeman, 1977). (Para obtener mayor información sobre este punto, pueden consultarse las secciones 1.4 y 2.3 del capítulo I). Dicha hipótesis resulta reforzada por los antecedentes ya mencionados y por los propios resultados expuestos en el capítulo anterior.

Asumiendo la posibilidad de que la ACh esté involucrada como neurotransmisor en las vías visuales, una interpretación para los datos obtenidos en este trabajo y en los de otros investigadores podría ser que la alteración en la liberación del neurotransmisor o en general, en el funcionamiento e integridad de la vía en cuestión, tuviera como consecuencia un cambio en la regulación de los receptores, en este caso los RChM, con una caída inicial tal vez atribuible a pérdidas en los receptores presinápticos y con un aumento posterior que podría ocultar dicha caída, tal vez debido a supersensibilidad por denervación, de los receptores postsinápticos. Esta interpretación resulta coherente con la disminución persistente en la actividad de AChE y con la localización postulada para los RChM en el SNC.

Es interesante comparar los resultados aquí expuestos con los obtenidos por Rose y Stewart (1978), quienes observaron un aumento en la fijación de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en la corteza visual de ratas que, luego de un período de oscuridad, fueron sometidas a la luz durante tres horas, con respecto a aquéllas mantenidas en oscuridad permanente.

Como en este tipo de experimentos la integridad de las vías visuales no está afectada, puede asumirse que los cambios en los parámetros estudiados están relacionados con fenómenos fisiológicos de tipo regulatorio.

Algunas investigaciones han demostrado que la estimulación visual puede tener influencia sobre el transporte de material por el axón. Grafstein y col. (1981) observaron que inactivando los nervios ópticos de *Carassius* por inyección intraocular de TTX, se redujo considerablemente el transporte axonal de nucleósidos. Por otra parte, Caputto y col. (1983) demostraron que la exposición a la luz de pollos con inyección intraocular de $[^3\text{H}]$ -ManNac, produjo un incremento en la radioactividad específica de los gangliósidos y de las glicoproteínas en el "tectum opticus".

Si se asume que la AChE está localizada principalmente en la presinapsis, la drástica y precoz reducción de esta enzima en el lóbulo óptico "deprivado", podría ser el resultado de un transporte más lento a lo largo de las fibras nerviosas, como podrían ser las retinotectales.

La reducción más discreta de los RChM, podría deberse a que el efecto esté limitado a los receptores presinápticos, que estuvieran siendo transportados hacia el "tectum". El transporte axonal de los RChM ha sido demostrado en el SNC de ratas (Wamsley, 1982).

Sin embargo, los cambios observados en este trabajo parecen transitorios, compensándose más tarde las diferencias durante el desarrollo postnatal del sistema visual.

Es posible que la deprivación visual a las pocas horas de la eclosión accione sobre el desarrollo de los receptores y de la AChE, debido a que se trata, tal vez, de un período especialmente crítico y que más tarde el cerebro sea capaz de compensar tal efecto.

1.2.1. Conclusiones acerca del desarrollo de los RChM y de la actividad de AChE en el SNC de pollo; influencia de la deprivación visual en los lóbulos ópticos.

En base a los resultados obtenidos, los datos bibliográficos presentados y los elementos discutidos en 1.1 y 1.2. en este mismo capítulo, puede arribarse a las siguientes conclusiones:

I. Las concentraciones de RChM en el SNC del pollo, al igual que en los Mamíferos en que se han estudiado, son al menos un orden de magnitud superiores a las de los receptores nicotínicos, en todas las regiones analizadas.

II. La mayor concentración de receptores muscarínicos se encuentra en la región correspondiente al "paleostriatum", homóloga de los ganglios basales de los Mamíferos, que también presentan una de las concentraciones más elevadas de RChM de todo el cerebro.

III. Hay una variación considerable en la ontogénesis de los RChM y de la actividad de AChE en las diferentes regiones del SNC del pollo, del mismo modo que ocurre en otras especies.

IV. En el cerebelo, tanto en el pollo (Jerusalinsky y col., 1981) como en el conejo (Yavin y Harel, 1979), se produce una marcada reducción en la concentración de RChM luego del nacimiento, sugiriéndose la posibilidad de que esté ocurriendo un cambio en la población neuronal. Esta llega a ser la región más pobre en dichos receptores y se observa una disociación

entre los dos parámetros colinérgicos estudiados.

V. El hecho de que cada región presente un modo especial de desarrollo de los RChM y de la actividad de AChE, sugiere la posibilidad de una relación entre estos parámetros y el crecimiento anatómico y establecimiento de funciones particulares de cada estructura.

VI. En particular, entre los días 17° y 18° del desarrollo, los lóbulos ópticos constituyen la región con mayor concentración y mayor cantidad de RChM (tabla 2.a.b); en este tiempo la mayoría de las fibras retinianas han alcanzado el techo óptico y la luz comienza a evocar potenciales allí en el día 18° (Sedláček, 1967; Blozowsky y Blozowsky, 1968).

La cantidad total de RChM se duplica entre el día del nacimiento y los 12 días de vida (tabla 2.b), duplicándose también la concentración proteica (tabla 1.a).

Los hechos mencionados sugieren que los RChM podrían estar involucrados en el desarrollo de la vía retinotectal y que la estimulación visual podría participar en el desarrollo de dichos receptores.

VII. Los niveles de AChE en los lóbulos ópticos, son muy pobres durante la vida embrionaria, hasta que tres o cuatro días antes de la eclosión, comienzan a aumentar rápidamente, hecho que resulta coincidente con el comienzo de la neurotransmisión efectiva, ya que, como se mencionó, alrededor del día 18° del desarrollo aparecen potenciales evocados en los lóbulos ópticos, por estimulación de las vías visuales.

Esta constituye la región del SNC del pollo con mayor actividad de AChE en el día de la eclosión (13.86 $\mu\text{mol}/\text{min}/$

/g de tejido), manteniéndose elevada en el animal adulto.

Como en el punto VI, los hechos aquí mencionados sugieren que la AChE podría estar participando del proceso de desarrollo de la vía en cuestión.

VIII. El desarrollo postnatal de los RChM en los lóbulos ópticos, sigue variaciones cualitativamente semejantes a las de los receptores colinérgicos nicotínicos (Wang y Schmidt, 1976) y a las de la actividad de AChE (Jerusalinsky y col., 1981) (figs. 9 y 10).

IX. Los experimentos en pollitos privados unilateralmente de estimulación luminosa desde el nacimiento, así como los antecedentes bibliográficos expuestos sobre las consecuencias de la enucleación o de la sección del nervio óptico, también refuerzan la suposición de que los RChM estén involucrados en la vía retinotectal y/o en sinapsis secundarias del techo óptico, ya que:

- 1) Los RChM del "tectum opticus" parecen estar regulados, al menos parcialmente, por el grado de inervación y por el estado funcional de las vías visuales (fig. 9).

- 2) En los primeros días de vida postnatal la actividad de AChE parece estar regulada, al menos en parte, por el estado funcional de la vía retinotectal.

- 3) La observación de un transporte de receptores muscarínicos en la vía septo-hipocámpica por Wamsley en 1982, permite suponer que ese transporte ocurre también en el presente caso, y que pueda ser afectado por la estimulación luminosa, como ocurre con otras

sustancias que viajan por el axón en esta vía nerviosa (Grafstein y col., 1981; Caputto y col., 1983).

X. Los antecedentes mencionados y los resultados expuestos, sugieren a la ACh como un fuerte candidato a neurotransmisor en la vía retinotectal de las Aves, sin descartar que existan otros neurotransmisores diferentes involucrados.

XI. Si se asume como altamente probable la hipótesis planteada, una posible interpretación para todos los datos expuestos sería que, la alteración en la liberación del neurotransmisor o, más en general, en el funcionamiento e integridad de la vía, tuviera como consecuencia un cambio en la regulación de los receptores, con una caída inicial tal vez atribuible a receptores presinápticos y un posterior aumento, tal vez atribuible a supersensibilidad de los receptores postsinápticos, por un efecto semejante al denervatorio.

Esta interpretación resulta coherente con la caída persistente en la actividad de AChE y con la localización postulada para los RChM en el SNC.

1.3. Localización de receptores colinérgicos muscarínicos y actividad de AChE en el hipocampo de la rata.

En los últimos años, además de los clásicos receptores postsinápticos que median la respuesta de la célula efectora, han sido reconocidos varios receptores presinápticos, que regulan la recaptación, síntesis y/o liberación del neurotransmisor en cuestión (ver 1.2.1. del capítulo I).

Hadházy y Szerb (1977) demostraron que la liberación de ACh endógena de cortes delgados o de sinaptosomas de corteza

cerebral de rata, se halla controlada por un mecanismo de retroalimentación negativa, probablemente mediado por "autorreceptores" muscarínicos presinápticos.

En el mismo laboratorio en que se realizó este trabajo de tesis, se desarrolló una técnica para disolver preferencialmente las membranas presinápticas en preparaciones sinaptosomales, por la acción de detergentes. Analizando la fijación de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ a sinaptosomas de cerebro de rata, pudo concluirse que los RChM están localizados tanto en la pre- como en la postsinapsis. En cambio, los receptores nicotínicos centrales parecen ser predominantemente postsinápticos (Aguilar y col., 1979).

Es importante tener en cuenta la dificultad para diferenciar entre receptores muscarínicos pre- y postsinápticos. Hasta el momento de desarrollarse los correspondientes experimentos, no habían podido hallarse diferencias farmacológicas entre los RChM presinápticos centrales y los postsinápticos, tanto centrales como periféricos (Bowen y Marek, 1982) desde que Iversen postulara en 1974, la existencia de autorreceptores. Por ello se hizo imperioso buscar diseños experimentales adecuados para discriminar entre ellos y verificar su existencia.

Los resultados obtenidos en los experimentos relacionados con la vía septo-hipocámpica, corroboran la localización postsináptica de la mayor parte de los RChM de la formación hipocámpica, estando ubicados, gran parte de ellos, en las neuronas piramidales de dicha estructura.

Pero luego de destruir una importante proporción de es-

tas neuronas, la denervación por sección de la vía septo-hipocámpica produjo una pequeña disminución de los RChM, lo que podría atribuirse a una población de receptores presinápticos.

Es posible que la denervación colinérgica de la formación hipocámpica, produzca un fenómeno de supersensibilidad postsináptica, con un aumento en el número de receptores muscarínicos postsinápticos, oscureciendo cualquier pequeño cambio atribuible a receptores presinápticos. Esto explicaría los resultados de otros investigadores que no observaron cambios en la población de dichos receptores, por sección de la fimbria-fórnix (Sábato y col., 1981).

1.3.1. Conclusiones acerca de la localización de los RChM y de la AChE en el hipocampo.

I. La importante caída en el número máximo de RChM, luego de la destrucción de las neuronas piramidales de las subregiones CA 3 a y b de la formación hipocámpica, corroboran la localización postsináptica de la mayor parte de dichos receptores (tabla 5).

II. La pequeña, pero significativa caída en la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en el hipocampo, luego de la deaferentación colinérgica, apoya la hipótesis de la presencia de RChM presinápticos, lo que resulta coherente con los antecedentes farmacológicos y fisiológicos, en relación con la autorregulación de la liberación de ACh en el hipocampo, así como en la corteza cerebral y en el estriado (Hadházhly y Szerb, 1977; Marchi y col., 1981) (tabla 6).

III. La disminución de la actividad de AChE por deafe-
rentación colinérgica resultó semejante con o sin destruc-
ción de las neuronas colinoceptivas del hipocampo. Es decir
que la AChE parece independiente, al menos en los tiempos es-
tudiados, de la neurona postsináptica, lo que apoya la hipó-
tesis de su posible localización presináptica (tabla 7).

1.4. Localización de RChM y actividad de AChE en el neocor- tex de la rata.

En relación a la inervación colinérgica de la corteza,
ya se ha mencionado en la "Introducción" (capítulo I) abun-
dante bibliografía, poniendo de manifiesto la importancia
de las neuronas basales magnocelulares que proyectan hacia
el neocortex.

Luego de la lesión de los cuerpos de dichas neuronas
por destrucción del nBM, pudo observarse una disminución en
el número de RChM, hecho que no había sido reportado con an-
terioridad, y una disminución en la actividad de la AChE de
la corteza cerebral.

Resulta fundamental tener en cuenta el curso temporal
de las observaciones, ya que los parámetros analizados no
alcanzan un estado estacionario, sino que siguen modificán-
dose. Este hecho podría ser explicado por un aumento poste-
rior en los RChM postsinápticos, debido probablemente a un
fenómeno regulatorio (como puede ser la supersensibilidad
por denervación) que terminaría enmascarando la disminución
detectada precozmente (Kamiya y col., 1981).

Al igual que en la vía septo-hipocámpica y en la posi-
ble participación colinérgica en la vía óptica del pollo,

en esta proyección colinérgica al neocortex habría receptores muscarínicos tanto pre- como postsinápticos, con diferente regulación, al menos en los tiempos considerados.

Es importante enfatizar que la considerable disminución en la actividad de AChE cortical luego de la lesión del nBM, es un indicador más de su posible localización presináptica, como lo sugiere también el hecho de que la destrucción de las neuronas corticales por aplicación de ácido kaínico, produjo sólo una pequeña disminución en la actividad de AChE y de ChAT (Lehmann y col., 1980; Wenk y col., 1980). Ello indicaría que hay solamente unas pocas neuronas colinérgicas - si alguna - en la corteza cerebral (Lehmann y col., 1980; Fibiger, 1982). La reproducción de estos experimentos, en el mismo laboratorio en que se desarrolló esta tesis, mostró un descenso del 18 % en la actividad de AChE cortical (Medina y Jerusalinsky, datos preliminares).

La disminución precoz en la fijación específica del antagonista muscarínico [^3H]-QNB, así como en la actividad de AChE en la hemicorteza contralateral a la lesión del nBM, (tabla 8.a.b) avalan la hipótesis que plantea la existencia de cierto grado de inervación contralateral, proveniente de las neuronas del nBM lesionado. Estos resultados están en concordancia con los estudios histológicos del nBM y de sus proyecciones, ya que luego de la inyección de HRP en una hemicorteza, aparecen marcadas unas pocas neuronas magnoce-lulares basales del lado opuesto (Divac, 1975). Tampoco puede ser descartado totalmente un sistema secundario de pro-

yecciones colinérgicas a la corteza cerebral (Wenk y col., 1980).

La demostración de la existencia de receptores muscarínicos presinápticos en el neocortex, puede tener considerables implicancias funcionales.

Recientemente se han involucrado mecanismos colinérgicos presinápticos en procesos de memoria y en diversas enfermedades de orden psiquiátrico, especialmente aquéllas relacionadas con el envejecimiento (Sherman y col., 1981).

Es sabido que en la enfermedad de Alzheimer y en patologías relacionadas (demencia presenil y senil de tipo Alzheimer) hay una notable disminución en la síntesis de ACh que parece deberse a pérdidas de algunos terminales presinápticos, con una disminución general de los marcadores colinérgicos en la corteza (Spillane y col., 1977).

Es por ello que las neuronas del nBM pueden considerarse de importancia en ciertos procesos neuropatológicos, así como en estudios de farmacología experimental y, potencialmente, de farmacología clínica.

1.4.1. Conclusiones acerca de la localización de los RChM y de la actividad de AChE en el neocortex.

I. Los resultados obtenidos luego de la lesión del nBM, corroboran la hipótesis de la existencia de RChM tanto pre- como postsinápticos en la corteza cerebral (tabla 8 a.).

II. Los receptores presinápticos estarían localizados sobre los terminales colinérgicos aferentes a la corte-

za, originados en las neuronas magnocelulares del nBM.

III. Los resultados obtenidos corroboran la existencia de una importante aferencia colinérgica al neocortex, originada en las grandes neuronas basales del nBM (Fibiger, 1982).

IV. Se sugiere que los RChM postsinápticos, que se presume están localizados preferencialmente sobre las membranas de las neuronas colinoceptivas, podrían sufrir un incremento, atribuible a un fenómeno de supersensibilidad por denervación (Pimoule y col., 1980; Kamiya y col., 1981).

V. Los resultados experimentales muestran una alteración en la actividad de AChE cuando se daña la neurona colinérgica, lo que sugiere una localización preferentemente presináptica para dicha enzima.

VI. Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos (Lehmann y col., 1980; Kimura y col., 1980) y los resultados obtenidos, existirían muy pocas neuronas colinérgicas en el neocortex de la rata.

1.5. Efectos de una condición estresante sobre los RChM en distintas regiones del SNC.

Para provocar el estrés se seleccionó una situación que resultara ineludible para el animal, que fuera muy reproducible y que produjera el agotamiento de la rata, en un período relativamente corto. En estas condiciones se produce un aumento en los niveles de ACh cerebrales en la rata (Karczmar y col., 1973; Saito y col., 1976), por lo que este modelo pa-

rece interesante para estudiar la regulación de los receptores colinérgicos muscarínicos en condiciones fisiológicas.

Los resultados obtenidos muestran que los cambios en los RChM, en dichas condiciones, son rápidos, específicos y reversibles, ya que otros neuroreceptores no se modificaron en el mismo sentido en las estructuras analizadas o simplemente no sufrieron cambios (Medina y col., 1982).

Con los datos obtenidos y en las condiciones experimentales descritas, no es posible hasta el presente dar una explicación concluyente de los mecanismos involucrados en la producción de los cambios en los RChM.

La disminución en la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ en la corteza cerebral y en los ganglios basales, podría resultar de un incremento en la liberación de ACh, como ocurre en los casos severos de estrés, lo que podría provocar una regulación por disminución del número de receptores (Anisman, 1978; Russell, 1982). Los RChM sufren regulación por disminución, bajo la acción de agonistas exógenos tales como oxotremorina (Ben-Barak y col., 1981) o por tratamiento con anticolinesterásicos como neostigmina, que producen un aumento del nivel de ACh (Costa y col., 1982).

El hecho de que el estrés por natación forzada provoque cambios tan rápidos en los receptores del SNC, tanto benzodiazepínicos como muscarínicos, sugiere que dichas variaciones no parecen deberse a modificaciones en la síntesis y/o degradación del receptor. Como una indicación, puede tenerse en cuenta que la pérdida de RChM en cultivo, luego de adición

de un agonista muscarínico, es más veloz que el incremento en el número de receptores luego de retirar el agonista del medio; sin embargo, la vida media del receptor en un cultivo conteniendo cicloheximida es de doce horas y con el agregado de carbacol se reduce a tres horas, tanto en células de neuroblastoma como en células de miocardio o de SNC (Klein, 1980). Dichos tiempos no parecen compatibles con los períodos en que se producen los cambios luego del tratamiento estresante aunque, por supuesto, las condiciones están muy lejos de ser analogables.

Teniendo en cuenta la rapidez con que ocurren los fenómenos descritos, puede pensarse en la existencia de algún mecanismo de oclusión o internalización y/o, según el caso, de desenmascaramiento o externalización de los receptores en la membrana plasmática. Recientemente se ha postulado que uno de los mecanismos de regulación de los receptores de membrana consistiría en la posibilidad de cambiar su posición en la misma o en la célula en general; de tratarse de esta última posibilidad, los correspondientes receptores podrían recuperarse en una fracción subcelular distinta (Strader y Lefkowitz, 1983).

En experimentos preliminares se han diseñado fraccionamientos que permitieran analizar la posibilidad de un cambio en la localización de los RChM, pero los resultados mostraron que éste no era el caso (Jerusalinsky y col., en preparación). Curiosamente, luego de sucesivos lavados de la fracción de membranas, desaparecieron las diferencias entre los animales estresados y los controles, al menos en el caso

de comenzado el mismo.

Acton y col. (1979) observaron que, luego de cromatografía en Sephadex G₂₅, podían obtenerse fracciones a partir de cerebro de vaca que eran capaces de inhibir la fijación específica de [³H]-QNB en ese mismo tejido. Recientemente, Díaz-Arrastia y col. (1985) obtuvieron una fracción del cerebro de oveja capaz de inhibir la unión del antagonista muscarínico QNB en cerebro de rata, en forma reversible y no competitiva.

En el presente caso resulta interesante considerar la hipótesis de la existencia de sustancias endógenas capaces de modular la unión de ligandos específicos para los RChM.

I. El desarrollo de los receptores colinérgicos muscarínicos y de la actividad de la enzima AChE guarda cierto paralelismo entre la especie de Aves estudiada y las especies de Mamíferos seguidas en su desarrollo por otros autores.

II. El desarrollo de los RChM resulta muchas veces paralelo al desarrollo de la actividad de AChE, pero en algunas regiones existe una clara disociación entre ambos parámetros, como es el caso del cerebelo del pollo y de algunos Mamíferos, estudiados por otros autores.

III. En las distintas regiones del cerebro, analizadas en los animales adultos, sí existe una relación directa entre el nivel de los RChM y la actividad de la enzima.

IV. Las concentraciones de RChM en el SNC del pollo, al igual que en las especies de Mamíferos en que se han estudiado, son al menos un orden de magnitud superiores a las de los receptores colinérgicos nicotínicos.

V. El hecho de que cada región tenga un modo especial de desarrollo de los RChM y de la actividad de la enzima AChE, sugiere que puede existir una relación entre dichos parámetros y el crecimiento y establecimiento de funciones particulares de cada estructura.

VI. En particular, los RChM y la actividad de AChE de los lóbulos ópticos del pollo parecen estar regulados, al menos en parte, por el grado de inervación y por el estado funcional de la vía retino-tectal. En consecuencia se sugiere

que la ACh puede ser un importante candidato a neurotransmisor en la vía retino-tectal y/o en sinapsis secundarias del "tectum opticus" del pollo.

VII. Los resultados obtenidos luego de lesionar neuronas piramidales de la formación hipocámpica de la rata por inyección intraventricular de AK, corroboran la localización post-sináptica de la mayor parte de los RChM en dicha estructura.

VIII. Los resultados obtenidos luego de lesionar las vías aferentes colinérgicas a la formación hipocámpica y la vía postulada en ese sentido a la corteza cerebral, en coincidencia con los datos fisiológicos y farmacológicos de la bibliografía, apoyan la hipótesis de la existencia de receptores colinérgicos muscarínicos localizados presinápticamente.

Además, se sugiere la posibilidad de una localización presináptica para los RChM que se modifican precozmente luego de la deprivación visual, en los lóbulos ópticos del pollo.

IX. Los resultados de los estudios realizados en la formación hipocámpica y en la corteza cerebral de la rata, muestran una alteración en la actividad de la enzima AChE cuando se daña la neurona colinérgica, lo que sugiere una localización predominantemente presináptica para la enzima de degradación del neurotransmisor ACh.

La misma sugerencia podría tener validez en la interpretación de los resultados obtenidos luego de la deprivación visual unilateral en los pollitos, aunque en ese caso no hubo daño de la neurona asumida como posiblemente colinérgica, pero sí se alteró la neurotransmisión.

X. Resulta de relevante importancia tener en cuenta el curso temporal de las observaciones que se realicen para estudiar la localización de neuroreceptores por medio de lesiones en el SNC, ya que los cambios que pueden producirse no son necesariamente estacionarios. En el presente caso se sugiere que los RChM postsinápticos podrían sufrir un incremento por un fenómeno de supuesta supersensibilidad por denervación, lo que podría enmascarar cambios -disminuciones- de pequeña envergadura, que serían detectables más precozmente.

XI. De acuerdo con los datos de la bibliografía y los resultados expuestos, existirían pocas neuronas colinérgicas, tanto en la formación hipocámpica como en la corteza cerebral de la rata.

XII. Los RChM del SNC de la rata pueden variar en forma rápida, específica y reversible -aparentemente difícil de explicar por cambios en su síntesis y/o degradación- en condiciones que pueden considerarse fisiológicas.

Se sugiere que los RChM de la corteza cerebral y de los ganglios basales de ratas sometidas a una condición estresante aguda, podrían sufrir un fenómeno de regulación por disminución, como consecuencia de un aumento en la liberación de ACh.

E. M. Roberts

Juan Ojeda

V. BIBLIOGRAFIA

- Eur. J. Pharmacol. 58: 343 (1979).
2. Aguilar, J.S., Criado, M. y De Robertis, E.
Eur. J. Pharmacol. 57: 227 (1979).
 3. Aguilar, J.S., Salas, P. y De Robertis, E.
Molec. Pharmacol. 22: 304. (1982).
 1. Anisman, H.
Neurochemical changes elicited by stress, en "Psychopharmacology of aversively motivated behavior". Eds. Anisman, H. y Bignani, G., pp. 119-172. Plenum Publishing corp. N.Y. (1978).

Ariëns Kappers, C.V., Huber, G.C. y Crosby, E.C.
En "The comparative anatomy of the Nervous System of Vertebrates". Vol. 2. Ed. Mac Millan. N.Y. (1936).
 6. Arikuni, T. y Ban, T.
Exp. Brain Res. 32: 69 (1979).
 7. Baratti, C.M.
Tesis de Doctorado: "Participación de mecanismos colinérgicos en procesos de aprendizaje y memoria animal. Su posible interrelación con mecanismos monoaminérgicos."
Dpto. de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A., Buenos Aires (1982).
 8. Barker, L.A.
Subcellular aspects of ACh metabolism, en "Biology of Cholinergic Function". Eds. Goldberg, A.M. y Hanin, I., pp. 203-238. (1976).
 9. Bartfai, T., Study, R.E. y Greengard, P.
Muscarinic stimulation and cGMP synthesis in the nervous

- system, en "Cholinergic mechanisms and psychopharmacology. Advances in behavioral biology." Ed. Jenden, D.J., pp. 285-295. Plenum Press. N.Y. (1977).
10. Ben-Ari, Y., Trembley, E. y Ottersen, O.P.
C.R. Acad. Sc. Paris, t 288, Serie D, pp.9991-994. (1979).
 11. Ben-Ari, Y., Lagowska, J., Tremblay, G. y Le Gal La Salle, G.
Brain Res. 163: 176. (1978).
 12. Ben-Barak, J. y Dudai, Y.
Brain Res. 193: 309. (1980).
 13. Ben-Barak, J., Gazit, H., Silman, I. y Dudai, Y.
Eur, J. Pharmacol. 74: 73. (1981).
 14. Bennet, J.P.
En "Neurotransmitter Receptor Binding." Eds. Yamamura, H.I., Enna, S.J. y Kuhar, M.J., p. 57. Raven Press.
N.Y. (1978).
 15. Bigl, V. y Schober, W.
Exp. Brain. Res. 27: 211. (1977).
 16. Blozowski, D. y Blozowski, M.
J. Physiol. (Paris) 60: 33. (1968).
 17. Bondy, S.C., Harrington, M.E. y Anderson, C.L.
Brain Res. Bull. 3: 411. (1978).
 18. Bowen, D.M. y Marek, K.L.
Br. J. Pharmacol. 75: 367. (1982).
 19. Bowen, D.M., Smith, C.B., White, P. y Davison, A.N.
Brain 99: 459. (1976).

20. Bowers, M.B., Goodman, E. y Sim, V.M.
J. Nerv. Ment. Dis. 138: 383. (1964).
21. Bray, G.A.
Anal. Biochem. 1: 279. (1960).
22. Brecha, N., Francis, A. y Schechter, N.
Brain Res. 167: 273. (1979).
23. Caputto, R., Caputto, B.L., Nores, G.A. y Cemborain, C.N. En "Neural transmission, learning and memory."
Eds. Caputto, R. y Ajmone Marsan, C., pp. 179-185.
Raven Press. N.Y. (1983).
24. Costa, L.G., Schwab, B.W. y Murphy, S.D.
Eur. J. Pharmacol. 80: 275. (1982).
25. Cowan, W.M., Adamson, L. y Powell, T.P.S.
J. Anat. 95: 545. (1961).
26. Coyle, J.T. y Schwarcz, R.
Nature 263: 244. (1976).
27. Coyle, J.T. y Yamamura, H.I.
Brain Res. 118: 429. (1976).
28. Coyle, J.T., Price, D.L. y De Long, M.R.
Science 219: 1184. (1983).
29. Daitz, H.M. y Powell, T.P.S.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 17: 75. (1954).
30. Dale, H.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 6: 147. (1914/15).
31. Davies, P.
Brain Res. 171: 319. (1979).

32. De Robertis, E., Alberici, M., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. y Azcurra, J.M.
Life Sci. 5: 577. (1966).
33. De Robertis, E., Azcurra, J.M. y Fiszler, S.
Brain Res. 5: 45. (1967).
34. De Robertis, E. y Rodríguez de Lores Arnaiz, G.
En "Handbook of Neurochemistry." Vol. II, pp. 365-392.
Ed. Lajtha, A. Plenum Press. N.Y. (1969).
35. Diaz-Arrastia, R., Ashizawa, T. y Appel, S.
J. Neurochem. 44: 622. (1985).
36. Divac, I.
Brain Res. 93: 385. (1975).
37. Drachman, D.A. y Leavitt, M.A.
Arch. Neurol. 30: 113. (1974).
38. East, J.M. y Dutton, G.R.
J. Neurochem. 34: 657. (1980).
39. Eldefrawi, M.E. y Eldefrawi, A.T.
ACh Receptors, en "Receptors and recognition." Eds. Cuatrecasas, P. y Greaves, M.F., 4: 197. Chapman and Halle, London. (1977).
40. Elkes, J. y Todrick, A.
En "Biochemistry of the developing nervous system." Ed. Waelsch, H. pp. 309-314. Academic Press. N.Y. (1955).
41. Ellman, G.L., Courtney, D.K., Andres, V. y Featherstone, R.M.
Biochem. Pharmacol. 7: 88. (1961).
42. Enna, S.J., Yamamura, H.I. y Snyder, S.H.
Brain Res. 101: 177. (1976).

43. Fibiger, H.C.
Brain Res. Rev. 4: 327. (1982).
44. Fields, J.Z., Roeske, W.R., Morkin, E. y Yamamura, H.I.
J. Biol.Chem. 253: 3251. (1978).
45. Fonnum, F.
J. Neurochem. 17: 1029. (1970).
46. Fonnum, F. y Walaas, I.
J. Neurochem. 31: 1173. (1978).
47. Francis, A., Jagannath, A. y Schechter, N.
Brain Res. 185: 161. (1980).
48. Francis, A. y Schechter, N.
Brain Res. 183: 224. (1980).
49. Freeman, J.A.
Nature (Lond) 269: 218. (1977).
50. Gilad, G.M., Rabez, J.M. y Shenkman, L.
Brain Res. 267: 171. (1983).
51. Ging-Kuo Wang y Schmidt, T.
Brain Res. 114: 525. (1976).
52. Gomez, C.J., Pasquini, J.M., Soto, E.F. y De Robertis, E.
J. Neurochem. 17: 1485. (1970).
53. Grafstein, B., Edwards, D.L. y Alpert, R.M.
Axonal transport and neuronal activity, en "Second
International Congress of Cell Biology." Ed. Schweiger,
H.G. pp. 729-736. Springer-Verlag. Berlin. (1981).
54. Gulati, A. Nata, C., Dhawan, K.H., Bhargava, K.P.,
Agarwal, A.K. y Seth, P.K.

- Brain Res. 240: 357. (1982).
55. Hadházy, P. y Szerb, J.C.
Brain Res. 123: 311. (1977).
56. Hanin, I.
Choline and ACh, en "Handbook of chemical assays methods."
Raven Press. N.Y. (1974).
57. Hattori, T. y McGeer, E.G.
Brain Res. 129: 174. (1977).
58. Herkenham, M. y Nauta, W.J.H.
J. comp. Neurol. 173: 123. (1977).
59. Hoover, D.B. y Jacobowitz, D.M.
Brain Res. 170: 113. (1979).
60. Hunt, S. y Schmidt, J.
Brain Res. 157: 213. (1978).
61. Hunt, S. y Schmidt, J.
Neuroscience 4: 585. (1979).
62. Iversen, L.
Biochemical aspects of synaptic modulation, en "The
Neuroscience third study program." Eds. Schmitt, F.O.
y Worden, F.G. pp. 905- 915. The MIT Press. Cambridge,
Mass. (1974).
63. Jerusalinsky, D.A., Aguilar, J.S., Brusco, A. y De
Robertis, E.
J. Neurochem. 37: 1517. (1981).
64. Johnston, M., McKinney, M. y Coyle, J.T.
PNAS 76: 5392. (1979).

65. Kamiya, H.-O., Rotter, A. y Jacobowitz, D.M.
Brain Res. 209: 432. (1981).
66. Karczmar, A.G.
Central actions of acetylcholine, cholinomimetics and related drugs, en "Biology of Cholinergic Function."
Eds. Goldberg, A.M. y Hanin, I. pp. 395-449. Raven Press. N.Y. (1976).
67. Karczmar, A.G. y Dun, N.J.
Sinapsis colinérgicas: consideraciones fisiológicas, farmacológicas y conductuales, en "Psicofarmacología."
Eds. Lipton, M., Di Mascio, A. y Killman, K. pp. 341-354. Edición española ESPAXS S.A. Rosellón, Barcelona. (1982).
68. Karczmar, A.G., Scuder, C.L. y Richardson, D.L.
Interdisciplinary approach to the study of behavior in related mice types, en "Chemical approaches to Brain Function." Eds. Ehrenfreis, S. y Kopin, I.J. pp. 160-244. Academic Press. N.Y. (1973).
69. Kelly, J.P. y Cowan, W.M.
Brain Res. 42: 263. (1972).
70. Kilbinger, H.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300: 145. (1977).
71. Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. y McGeer, E.G.
Science 208: 1057. (1980).
72. Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. y McGeer, E.G.
J. comp. Neurol. 200: 151. (1981).
73. Klein, W.L.
Proc. West Pharmacol. Soc. 23: 449. (1980).

74. Kloog, Y., Egozi, Y. y Sokolovsky, M.
Mol. Pharmacol. 15: 545. (1979).
75. Konig, J.F. y Klippel, R.A.
En "The Rat Brain: A stereotaxic atlas of the forebrain
and lower parts of the brain stem."Eds. Williams and
Wilkins, Baltimore. (1963).
76. Kouvelas, E.D.
Int. Soc. Dev. Neurosci. 1:292. (1980).
77. Kouvelas, E. D. y Greene, L.A.
Brain Res. 113: 111. (1976).
78. Kouvelas, E.D., Luckenbill-Edds, L., La Vail, J.H. y
Greene, L.A.
Neurosci. Lett. 11: 99. (1979).
79. Kristt, D.A. y Kasper, E.K.
Develop. Brain Res. 8: 373. (1983).
80. Krnjevic, K.
Physiol. Rev. 54: 418. (1974).
81. Krnjevic, K. y Silver, A.
J. Anat. 100: 63. (1966).
82. Krnjevic, K. y Phillis, J.W.
J. Physiol. (Lond) 166: 328. (1963).
83. Kuhar, M.J.
The anatomy of cholinergic neurons, en "Biology of
cholinergic function." Eds. Goldberg, A.M. y Hanin, I.
pp. 3-27. Raven Press. N.Y. (1976).
84. Kuhar, M.J., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V. y Hulme,
E.C.

- Brain Res. 184: 375 (1980).
35. Kuhar, M.J., Sethy, V.H., Roth, R.H. y Aghajanian, G.K.
J. Neurochem. 20: 581 (1973).
86. Kuhar, M.J. y Yamamura, H.I.
Nature (Lond) 253: 560 (1975).
87. Kuhar, M.J. y Yamamura, H.I.
Brain Res. 110: 229 (1976).
88. Langer, S.Z.
Br. J. Pharmacol. 60: 481 (1977).
89. Langer, S.Z.
Trends. in Neurosci. 3:110 (1980).
90. Lehmann, J. y Fibiger, H.C.
Life Sci. 25: 1939 (1979).
91. Lehmann, J., Nagy, J.I., Atmadja, S. y Fibiger, H.C.
Neuroscience 5: 1161 (1980)
92. Lewis, P.R. y Shute, C.C.D.
Brain 90: 521 (1967).
93. Lewis, P.R., Shute, C.C.D. y Silver, A.
J. Physiol. (Lond) 191: 215 (1967).
94. Longo, V.G.
Pharmacol. Rev. 18: 965 (1966).
95. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.
J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).
96. Marchi, M., Paudice, P. y Raiteri, M.
Eur. J. Pharmacol. 73: 75 (1981).
97. Marchisio, P.C.

- J. Neurochem. 16: 665 (1969).
98. McGeer, E.G. y McGeer, P.L.
Nature 263: 517 (1976).
99. McGeer, P.L. y McGeer, E.G.
Central cholinergic pathways, en "Nutrition and the
Brain." Eds. Barbeau, A., Growdon, J.H. y Wurtman, R.J.,
vol. 5, pp. 177-199. Raven Press, New York (1979).
100. McGeer, P.L., McGeer, E.G., Sing, V.K. y Chase, W.H.
Brain Res. 81: 373 (1974).
101. McKinney, M. y Coyle, J.T.
J. Neurosci. 2: 97 (1982).
- 102.. Medina, J.H., Novas, M.L. y De Robertis, E.
Eur. J. Pharmacol. 90: 125 (1983).
- 103.. Medina, J.H., Novas, M.L., Wolfman, C.N., Levi de Stein,
M. y De Robertis, E.
Comunicaciones Biológicas 1: 17 (1982).
- 104.. Medina, J.H. , Novas, M.L., Wolfman, C.N., Levi de Stein,
M. y De Robertis, E.
Neuroscience 9: 331 (1983).
- 105.. Mellgren, S.I. y Srebro, B.
Brain Res. 52: 19 (1973).
- 106.. Mesulam, M.-M., Van Hoesen, G.W. y Rosene, D.L.
Neurosci. Abst. 3: 202 (1977).
- 107.. Michell, J.F.
J. Physiol. 165: 98 (1963).
- 108.. Miledi, R., Molenaar, P.C. y Polak, R.L.
Nature (Lond) 272: 641 (1978).

109. Miledi, R., Molinoff, P. y Potter, L.T.
Nature 229: 554 (1971).
110. Millhouse, O.E.
Brain Res. 15: 341 (1969).
111. Mosko, S., Lynch, G. y Cotman, C.W.
J. comp. Neurol. 152: 163 (1973).
112. Myers, R.D.
En "Handbook of drug and chemical stimulation of the
brain." Eds. Van Nostrand-Reinhold. New York (1974).
113. Nadler, J.V., Perry, B.W. y Cotman, C.W.
Nature 271: 676. (1978).
114. Nadler, J.V., Perry, B.W. y Cotman, C.W.
Brain Res. 182: 1. (1980).
115. Nagy, J.I., Vincent, S.R., Lehmann, J., Fibiger, H.C.
Y McGeer, E.G.
Brain Res. 149: 431 (1978).
116. Noble, E. Wurtman, R. y Axelrod, J.
Life Sci. 6: 281 (1967).
117. Olney, J.W. y de Gubareff, T.
Brain Res. 140: 340 (1978).
118. Oppenheim, R.W. y Foelix, R.F.
Nature 235: 126 (1972).
119. Oswald, R.E. y Freeman, J.A.
Life Sci. 27: 527 (1980).
120. Oswald, R.E., Schmidt, D.E. y Freeman, J.A.
Neuroscience 4: 1129 (1979).

121. Overstreet, D.H., Speth, R.C., Hruska, R.E., Ehlert, F.,
Dumont, Y. y Yamamura, H.I.
Brain Res. 195: 203 (1980).
122. Pepeu, G.
Progr. Neurobiol. 2: 257 (1973).
123. Perry, E.K. y Perry, R.H.
TINS 261 Agosto (1982).
124. Peters, J.J., Vonderahe, A.R. y Powers, T.H.
J. Exp. Zool. 133: 505 (1956).
125. Phillipson, O.T.
J. comp. Neurol. 187: 117 (1979).
126. Phillis, J.W.
Brain Res. 7: 378 (1968).
127. Pimoule, C., Briley, M., Arbilla, S. y Langer, S.Z.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 312: 15 (1980).
128. Polz-Tejera, G., Schmidt, J. y Karten, H.J.
Nature (Lond) 258: 349 (1975).
129. Por, S.B. y Bondy, S.C.
J. Neurochem. 38: 545 (1982).
130. Potemska, A., Skangiel-Kramska, J. y Kossut, M.
Develop. Neurosci. 2: 38 (1979).
131. Raisman, F.
Brain 89: 317 (1966).
132. Ramon-Moliner, E. y Nauta, W.J.H.
J. comp. Neurol. 126: 311 (1966).
133. Robinson, J.H. y Deadwyler, S.A.

- Brain Res. 221: 117 (1981).
134. Rose, A.M., Hattori, T. y Fibiger, H.C.
Brain Res. 108: 170 (1976).
135. Rose, S.P.R. y Stewart, M.G.
Nature 271: 169 (1978).
136. Rossier, J.
J. Neurochem. 26: 543 (1976).
137. Rossier, J.
Neuroscience 6: 989 (1981).
- 138a. Rotter, A., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V., Field, P.M.,
Hulme, E.C. y Raisman, G.
Brain Res. Rev. 1: 141 (1979).
- 138b. Rotter, A., Field, P.M. y Raisman, G.
Brain Res. Rev. 1: 185 (1979).
139. Russell, R.W.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22: 435 (1982).
140. Sábato, U.C., Aguilar, J.S., Medina, J.H. y De Robertis,
E.
Neurosci. Lett. 27: 193 (1981).
141. Saito, H., Morita, A., Miyazaki, I. y Takagi, K.
Comparison of the effect of various stresses on biogenic
amines in the central nervous system and animal symptoms,
en "Catecholamines and stress." Eds. Usdin, E., Kvetnansky,
R. y Kopin, I.J. pp. 95-103. Pergamon Press, Oxford (1976).
142. Salvaterra, P.M. y Fodors, R.M.
J. Neurochem. 32: 1509 (1979).

143. Scatchard, G.
Ann. NY Acad. Sci. 51: 660 (1949).
144. Schwarcz, R., Zaczek, R. y Coyle, J.T.
Eur. J. Pharmacol. 50: 209 (1978).
145. Sedláček, J.
Physiol. Bohemoslov. 16: 531 (1967).
146. Segal, M., Dudai, Y. y Amsterdam, A.
Brain Res. 148: 105 (1978).
147. Shaw, C., Needler, M.C. y Cynader, M.
Develop. Brain Res. 14: 295 (1984).
148. Sherman, K.A., Kuster, J.E., Dean, R.L. y Friedman, E.
Neurobiol. Aging 2: 99 (1981).
149. Shute, C.C.D.
Distribution of cholinesterase and cholinergic pathways,
en "The Hypothalamus." Eds. Martini, L., Motta, M. y
Fraschini, F., pp. 167-179. Academic Press, N. Y. (1970).
150. Shute, C.C.D. y Lewis, P.R.
Nature (Lond) 205: 242. (1965).
151. Shute, C.C.D. y Lewis, P.R.
Brain 90: 497. (1967).
152. Silver, A.
Prog. Brain Res. 34: 345 (1971).
153. Spillane, J., White, P., Goodhart, M., Flack, R., Bowen,
D.M. y Davison, A.
Nature (Lond) 266: 558 (1977).
154. Squire, L.R. y Davis, H.P.
Ann. Rev. Pharmacol. 21: 323 (1981).

155. Stingelin, W. y Senn, D.G.
Ann. NY Acad. Sci. 167: 156. (1969).
156. Strader, C.D. y Lefkowitz, R.J.
Soc. Neurosci. Abst. 9: 1119. (1983).
157. Szerb, J.C.
En "Cholinergic mechanisms and psychopharmacology."
Ed. Jenden, D.J., p. 49. Plenum Press, N.Y. (1977).
158. Szerb, J.C.
En "Presynaptic Receptors." Eds. Langer, S.Z., Starke, K.
y Dubocovich, M.L. Advances in Biosci. 18: 129. Pergamon
Press, Oxford. (1980).
159. Wamsley, J.K., Zarbin, M.A., Birdsall, N.J.M. y Kuhar, M.J.
Brain Res. 200: 1. (1980).
160. Wamsley, J.K.
Eur. J. Pharmacol. 86: 309. (1982).
161. Wang, C. y Schmidt, T.
Brain Res. 114: 525. (1976).
162. Wenk, H., Bigl, V. y Meyer, V.
Brain Res. Rev. 2: 195. (1980).
163. Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W.,
Coyle, J.T. y Delone, M.R.
Science 215: 1237. (1982).
164. Wood, N. y Rose, S.P.R.
Behav. and Neural Biol. 25: 79. (1979).
165. Yamamura, H.I., Kuhar, M.J., Greenburg, D. y Snyder, S.H.
Brain Res. 66: 541. (1974).

166a. Yamamura, H.I. y Snyder, S.H.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71: 1725. (1974).

166b. Yamamura, H.I. y Snyder, S.H.

Brain Res. 78: 320. (1974).

167. Yavin, E. y Harel, S.H.

FEBS Lett. 97: 151. (1979).

ABREVIATURAS.

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AK	Acido kaínico
Am	Amígdala
ATC	Acetil-tio-colina
AVT	Area tegmental ventral
BD	Banda diagonal
B _{máx.}	Número máximo de sitios de unión específica
B.O.	Bulbo olfatorio
CH	Corea de Huntington
ChAT	Colinacetiltransferasa
Ci	Curics
Cx	Corteza cerebral
DA	Dopamina
DSTA	Demencia presenil (o senil) de tipo Alzheimer
DTNB	Di-tio-bis-nitrobenzoico (ácido)
EEG	Electroencefalograma
ESM	Error estándar de la media
FH	Formación hipocámpica
FR	Formación reticular
GB	Ganglios basales
GP	Globo pálido
H	Hipocampo
³ H -QNB	Benzilato de quinuclidina tritiado
HRP	Peroxidasa de rábano
i.p.	Intraperitoneal
K _D	Constante de disociación aparente
LO	Lóbulo óptico

LO _c	Lóbulo Óptico control (psilateral)
LO _d	Lóbulo Óptico deprivado (contralateral)
nBM	Núcleo basal magnocelular
NE	Norepinefrina
N _H	Número de Hill
nPM	Núcleo preóptico magnocelular
nSM	Núcleo septal medial
QNB	Benzilato de quinuclidina
RChM	Receptores colinérgicos muscarínicos
SM	Septum medial
SNC	Sistema nervioso central
SN	Sistema nervioso
SNP	Sistema nervioso periférico