

## Tesis de Posgrado

# Demostración de un período crítico de plasticidad nerviosa durante el desarrollo postnatal del cuerpo estriado de rata : Cambios permanentes del sistema colinérgico-dopaminérgico dependientes de la estimulación motora

Rurico Ibarra, Gustavo

1997

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rurico Ibarra, Gustavo. (1997). Demostración de un período crítico de plasticidad nerviosa durante el desarrollo postnatal del cuerpo estriado de rata : Cambios permanentes del sistema colinérgico-dopaminérgico dependientes de la estimulación motora. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

**Cita tipo Chicago:**

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2915\\_RuricoIbarra.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2915_RuricoIbarra.pdf)  
Rurico Ibarra, Gustavo. "Demostración de un período crítico de plasticidad nerviosa durante el desarrollo postnatal del cuerpo estriado de rata : Cambios permanentes del sistema colinérgico-dopaminérgico dependientes de la estimulación motora". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2915\\_RuricoIbarra.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2915_RuricoIbarra.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEMOSTRACION DE UN PERIODO CRITICO DE PLASTICIDAD  
NERVIOSA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL  
DEL CUERPO ESTRIADO DE RATA

CAMBIOS PERMANENTES  
EN EL SISTEMA COLINERGICO Y ADMINERGICO  
DEPENDIENTES DE LA ESTIMULACION MOTORA

AUTOR: Lic. GUSTAVO RURICO IBARRA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JULIO M. ROSA ZCURRA

LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

AÑO 1997

129153

402

## INDICE

### RESUMEN

### ABSTRACT

## 1. INTRODUCCIÓN

### **1.1. PLASTICIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

- 1.1.1. El Sistema Nervioso Central y los mecanismos plásticos
- 1.1.2. Desarrollo de la plasticidad en el Sistema Nervioso Central
- 1.1.3. Modelos para el estudio de la plasticidad
- 1.1.4. Estimulación motora y plasticidad motora
- 1.1.5. Los mecanismos plásticos y la importancia de los neuroreceptores
- 1.1.6. Importancia del estudio de la plasticidad durante el desarrollo

### **1.2. COMPORTAMIENTO MOTOR Y LA PLASTICIDAD MOTORA**

- 1.2.1. Significado del estudio del comportamiento motor
- 1.2.2. Inducción de mecanismos plásticos por la actividad motora
- 1.2.3. Pruebas para el análisis del comportamiento
- 1.2.4. Estudio del comportamiento motor
  - 1.2.4.1. El entrenamiento rotatorio y la inducción de cambios plásticos
  - 1.2.4.2. El Test de Entrenamiento Circular (TEC)
  - 1.2.4.3. El Test del Disco Giratorio (TDG)

### **1.3. EL CUERPO ESTRIADO EN EL ESTUDIO DE LOS CAMBIOS PLASTICOS**

- 1.3.1. Elección del cuerpo estriado
- 1.3.2. El cuerpo estriado y la actividad motora
- 1.3.3. Procesos de aprendizaje y memoria
- 1.3.4. Mecanismos de recompensa y motivación
- 1.3.5. El cuerpo estriado, los mecanismos plásticos y su importancia clínica

### **1.4. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL CUERPO ESTRIADO**

- 1.4.1. Anatomía funcional y organización estructural
- 1.4.2. Tipos neuronales
- 1.4.3. Conexiones neuronales del cuerpo estriado
- 1.4.4. El sistema colinérgico-dopaminérgico
- 1.4.5. Aspectos neuroquímicos
- 1.4.6. Desarrollo del cuerpo estriado

### **1.5. EL RECEPTOR COLINERGICO MUSCARINICO**

- 1.5.1. El sistema colinérgico y la plasticidad del Sistema Nervioso
- 1.5.2. El receptor colinérgico muscarínico
- 1.5.3. Mecanismos de señalización intracelular
- 1.5.4. Distribución en el Sistema Nervioso Central
- 1.5.5. El receptor colinérgico muscarínico en el cuerpo estriado

## OBJETIVOS

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. MATERIALES**

- 2.1.1. Drogas
  - 2.1.1.1. Determinación de receptores
  - 2.1.1.2. Inmunohistoquímica
  - 2.1.1.3. Amplificación de ARN por RT-PCR
  - 2.1.1.4. Otras metodologías
- 2.1.2. Instrumentos
- 2.1.3. Animales
  - 2.1.3.1. Cepas utilizadas
  - 2.1.3.2. Mantenimiento de animales

### **2.2. ENTRENAMIENTOS**

- 2.2.1. Test de Entrenamiento Circular
  - 2.2.1.1. Diseño y caracterización del equipo
  - 2.2.1.2. Entrenamiento en el TEC
  - 2.2.1.3. Cuantificación del comportamiento
  - 2.2.1.4. Animales controles
  - 2.2.1.5. Criterios de descarte
  - 2.2.1.6. Esquemas de entrenamientos y tiempos de sacrificio
    - 2.2.1.6.1. Entrenamiento a distintas edades
    - 2.2.1.6.2. Estudios a distintos tiempos post-entrenamiento
    - 2.2.1.6.3. Comparación de la respuesta de machos y hembras
    - 2.2.1.6.4. Comparación de la respuesta de distintas cepas
    - 2.2.1.6.5. Estudio del entrenamiento en distintos meses del año
    - 2.2.1.6.6. La respuesta motora y el sentido de giro
    - 2.2.1.6.7. Distintas sesiones de entrenamiento
- 2.2.2. Test del Disco Giratorio
  - 2.2.2.1. Diseño del equipo
  - 2.2.2.2. Procedimiento de entrenamiento
  - 2.2.2.3. Criterio de descarte
  - 2.2.2.4. Esquemas de entrenamiento y tiempos de sacrificio
    - 2.2.2.4.1. Entrenamientos para estudios del efecto a largo plazo
      - 2.2.2.4.1.1. Distintos tiempos post-entrenamiento
      - 2.2.2.4.1.2. Distintas sesiones de entrenamiento
    - 2.2.2.4.2. Entrenamientos para el estudio de los cambios inmediatos

## **2.3. OBTENCION DEL TEJIDO PARA ESTUDIOS NEUROQUIMICOS**

- 2.3.1. Disección del Sistema Nervioso
- 2.3.2. Fraccionamiento subcelular

## **2.4. DETERMINACIONES NEUROQUIMICAS**

- 2.4.1. Determinaciones bioquímicas generales
  - 2.4.1.1. Determinación de acetilcolinesterasa
  - 2.4.1.2. Determinación de proteínas
- 2.4.2. Medición de neuroreceptores
  - 2.4.2.1. Evaluación del receptor colinérgico muscarínico
    - 2.4.2.1.1. Determinación de la afinidad y el número de receptores
    - 2.4.2.1.2. Técnica de filtración
    - 2.4.2.1.3. Medición del mAChR como marcador de fracción
  - 2.4.2.2. Determinación del receptor dopaminérgico D1
  - 2.4.2.3. Determinación del receptor dopaminérgico D2
  - 2.4.2.4. Determinación del receptor glutamatérgico NMDA
  - 2.4.2.5. Cuantificación radioactiva
- 2.4.3. Estudios de fosforilación *in vitro*
- 2.4.4. Análisis de la expresión del ARN de mAChR
  - 2.4.4.1. Extracción de ADN de corteza cerebral
  - 2.4.4.2. PCR del ADN extraído
  - 2.4.4.3. Extracción de ARN
  - 2.4.4.4. Producción del ADN copia a partir del ARN extraído
  - 2.4.4.5. RT-PCR
  - 2.4.4.6. Separación del producto de PCR por electroforesis
  - 2.4.4.7. Cuantificación del producto de PCR
    - 2.4.4.7.1. Interpretación cualitativa por visualización directa
    - 2.4.4.7.2. Análisis semicuantitativo del producto de amplificación
- 2.4.5. Inmunohistoquímica
  - 2.4.5.1. Fijación del tejido
  - 2.4.5.2. Procesamiento y cortes histológicos
  - 2.4.5.3. Detección inmunohistoquímica de NF, GFAP y c-fos
  - 2.4.5.4. Consideraciones para los ensayos inmunohistoquímicos

## **2.5. ANALISIS ESTADISTICO**

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO EN LOS TESTS**

##### 3.1.1. Estudios en el TEC

##### 3.1.1.1. Evaluación del comportamiento motor y el aprendizaje asociativo

##### 3.1.1.1.1. Comparación entre animales de distintas edades

##### 3.1.1.1.2. Animales entrenados a los 30 días

##### 3.1.1.1.2.1. Comparación de machos y hembras

##### 3.1.1.1.2.2. Respuesta de machos de distintas cepas

##### 3.1.1.1.2.3. Comportamiento circanual

##### 3.1.1.1.2.4. Evolución del peso de los animales

##### 3.1.2. Comportamiento en el Test del Disco Giratorio

#### **3.2. CONDICIONES DEL TEJIDO PARA ESTUDIOS NEUROQUIMICOS**

##### 3.2.1. Disección y fraccionamiento subcelular

##### 3.2.1.1. Determinación del peso y concentración de proteínas

##### 3.2.1.2. Medición de AchE y unión de <sup>3</sup>H-QNB en fracciones subcelulares

#### **3.3. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LOS PARAMETROS NEUROQUIMICOS**

##### 3.3.1. Estudio de los efectos a largo plazo sobre el mAChR

##### 3.3.1.1. Efecto del TEC sobre el mAChR del cuerpo estriado

##### 3.3.1.1.1. Efecto del TEC a distintas edades

##### 3.3.1.1.2. La caída del mAChR es independiente del sentido de giro

##### 3.3.1.1.3. La reducción es similar en ambas cepas de animales

##### 3.3.1.1.4. Los cambios del mAChR son permanentes

##### 3.3.1.1.5. La caída del mAChR depende de la actividad realizada

##### 3.3.1.1.6. Baja correlación con la velocidad de giro

##### 3.3.1.1.7. La alteración es independiente del aprendizaje asociativo

##### 3.3.1.1.8. Los cambios son similares en distintas subfracciones

##### 3.3.1.2. Efectos del TDG sobre el mAChR

##### 3.3.1.2.1. Reducción de los niveles del mAChR luego del TDG

##### 3.3.1.2.2. Los cambios también son a largo plazo

##### 3.3.1.2.3. La caída está relacionada con la distancia recorrida

##### 3.3.1.2.4. También está asociada con la velocidad de giro

##### 3.3.1.3. Efectos del entrenamiento en distintas áreas cerebrales

##### 3.3.2. Efectos a largo plazo sobre otros marcadores moleculares

##### 3.3.2.1. Determinación de otros neuroreceptores

##### 3.3.2.1.1. Receptor dopaminérgico D2: correlación con el mAChR

##### 3.3.2.1.2. Receptor dopaminérgico D1 y de glutamato tipo NMDA

##### 3.3.2.2. Cambios a largo plazo en la transcripción del mAChR

##### 3.3.2.2.1. Especificidad de las sondas

##### 3.3.2.2.2. Extracción de ARN en los distintos grupos experimentales

##### 3.3.2.2.3. Transcripción mAChR. RT-PCR de los subtipos M1 y M4

##### 3.3.2.3. Determinación de acetilcolinesterasa

##### 3.3.2.4. Evaluación de marcadores inmunohistoquímicos

##### 3.3.3. Estudio de los efectos inmediatos de la actividad funcional

##### 3.3.3.1. Cambios inmediatos del mAChR luego del TDG

##### 3.3.3.2. Respuesta del mAChR a la fosforilación *in vitro* por pKC

##### 3.3.3.3. Determinación de la expresión de c-fos

## **4. DISCUSION**

### **4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL - SELECCION DEL MODELO**

### **4.2. DEMOSTRACION DE UN PERIODO CRITICO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL CUERPO ESTRIADO**

4.2.1. El TEC produce una caída del mAChR si se entrena a los 30 días de edad

4.2.2. La respuesta no es igual entre los dos sexos

4.2.3. La respuesta es proporcional a los metros recorridos

4.2.4. El cambio es permanente

4.2.5. Existe un período crítico limitado para que se produzcan los cambios

4.2.6. Reducción de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 pero no del NMDA

4.2.7. Posibles eventos en la reducción del número de neuroreceptores

4.2.8. Diferencias de los subtipos del mAChR en la transcripción

4.2.9. Los cambios son particulares de estructuras motoras

4.2.10. También disminuyen los niveles de AchE y la detección de NF

### **4.3. EL GRADO DE ALTERACION NEUROQUIMICA DEPENDE DEL GRADO DE ESTIMULO MOTOR**

### **4.4. LOS CAMBIOS PERMANENTES EN EL mAChR SE CORRELACIONAN CON CAMBIOS INMEDIATOS**

4.4.1. Internalización inmediata del mAChR luego del TDG: un posible paso inicial en la generación de los cambios permanentes

4.4.2. La estimulación de c-fos puede potenciar los cambios plásticos

### **4.5. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS RESULTADOS**

## **CONCLUSIONES**

## **REFERENCIAS**

## **TRABAJOS PUBLICADOS**

## **AGRADECIMIENTOS**

## RESUMEN

En el Test de Entrenamiento Circular, los animales recorren hasta 1 km en un total de 7 días. Esta actividad motora produce una reducción permanente del 35% en la densidad del receptor colinérgico muscarínico (mAChR) y del 40% en el receptor dopaminérgico subtipo D2 del cuerpo estriado. La caída es proporcional a la cantidad de metros recorridos y sólo se produce en un «período crítico» del desarrollo postnatal (días 30 a 37), mientras que el entrenamiento realizado antes (20-27 días) o después (40-97 días) no produce cambios. Junto con estas alteraciones, se observa una reducción del 22% en el receptor dopaminérgico subtipo D1, así como una disminución del área dendrítica, de acuerdo a la inmunomarcación de neurofilamentos. Entre otras áreas cerebrales estudiadas, la corteza motora muestra una reducción del 22% en el mAChR, pero ninguna variación se observa en la corteza frontal, occipital, hipocampo, cerebelo o amígdala, lo que indica que la alteración neuroquímica es específica de las estructuras motoras. El estudio de la transcripción de los principales subtipos estriatales del mAChR (M1 y M4), demuestran una respuesta diferencial en las distintas subpoblaciones neuronales proyectivas del cuerpo estriado. La expresión del subtipo M1 está reducida en un 50%, mientras que el subtipo M4 presenta niveles 3 veces superiores luego del entrenamiento, lo que indica un desfase entre la transcripción y la traducción del mAChR.

La realización de una segunda prueba de actividad motora, el Test del Disco Giratorio, confirma los cambios en el mAChR, demostrando que la caída es proporcional a la distancia recorrida y a la velocidad de giro. Todos los cambios descriptos continuaban presentes luego de 6 meses de realizado el entrenamiento.

En el corto plazo, los animales entrenados en el Test del Disco Giratorio presentan una reducción del mAChR compatible con una posible internalización y degradación del receptor, al igual que una inducción de la expresión del proto-oncogén c-fos. Estos cambios plásticos inmediatos podrían representar los pasos iniciales que conducen al establecimiento de cambios neuroquímico perdurables.

El presente trabajo demuestra la presencia de un período crítico durante el desarrollo postnatal del Sistema Nervioso Central durante el cual la estimulación motora puede generar cambios permanentes de la conectividad sináptica en una forma dependiente de la actividad.



## ABSTRACT

In a Circling Training Test, rats were trained to run up to 1 km during 7 days. This motor activity triggered a permanent reduction of 35% and 40% of striatal muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) and D2 dopaminergic receptor densities, respectively. This variation was correlated to the total distance run and was only observed in a «critical period» during postnatal development (days 30 to 37). Training performed before (20 -27 days) or after (40-97 days) did not affect receptor densities. Together with these modifications, circling training induced a 22% decrease of D1 dopaminergic receptor, and a reduction of the dendritic area, evaluated by immunohistochemical detection of neurofilaments.

Of other brain areas evaluated, motor cortex showed a 22% reduction of mAChR but no change was seen in frontal and occipital cortex, hippocampus, cerebellum or amigdala. Thus, neurochemical alteration was specific of motor structures. Furthermore, the study of M1 and M4 mAChR subtypes transcription showed a differential response in the distinct striatal projective neuron subpopulations. M1 expression was reduced by 50% and M4 showed a three fold level increment after training.

A second motor test, the Turn Table Test confirm that mAChR variation is correlated to the distance run and the speed. All the change detected were still present 6 month after training was performed.

In the short term, animals trained in the Turn Table Test showed a reduction of mAChR binding which could indicate receptor internalization and degradation. Training also induced c-fos expression. These early changes could represent the initial steps underlying permanent neurochemical alterations.

This investigation demonstrate the presence of a critical period during postnatal Central Nervous System development where motor stimulation could trigger activity dependent permanent alteration of synaptic connectivity.

**PALABRAS CLAVES:**

**Sistema Nervioso Central, cuerpo estriado, desarrollo, rata, actividad motora, plasticidad, período crítico, receptor colinérgico muscarínico, receptor dopaminérgico D2, receptor dopaminérgico D1, alteración permanente, reorganización sináptica, expresión de c-fos**

**KEY WORDS:**

**Central Nervous System, rat striatum, development, motor activity, plasticity, critical period, acetylcholine muscarinic receptor, D2 dopaminergic receptor, D1 dopaminergic receptor, permanent alteration, synaptic reorganization, c-fos expression.**

## ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMPc	3',5' monofosfato de adenosina ciclica
ANOVA	Método estadístico para el análisis de varianza
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
Bmax	Número máxima de un tipo de receptor
CAT	Colina acetiltransferasa
dNTP	Deoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
DPM	Desintegraciones por minuto
DTNB	Acido 1,5 ditio-2-nitrobenzoico
DTT	1,4 ditiotritol
EA	Errores Acumulados
EDTA	Acido etilen-diamin-tetra-acético
GABA	Acido gama-aminobutirico
GFAP	Proteína acida glio fibrilar
GMPc	3',5' monofosfato de guanosina ciclica
Kd	Constante de afinidad de un tipo de receptor
mAChR	Receptor Colinérgico Muscarinico
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina
NF	Neurofilamento
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMS	N-metilescopolamina

PBS	Buffer Fosfato Salino
PBS-T	Buffer Fosfato Salino con Tx-100
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA	Paraformaldehído
pKA	Proteín quinasa A
pKC	Proteín quinasa C
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de metilsulfonilo
POPOP	2,2'-fenilen-bis(5-feniloxazol)
PPO	2,5 difeniloxazol
QNB	Quinuclidinilbenzilato
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimeras luego de Transcripción Reversa
SCH23390	
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TDG	Test del Disco Giratorio
TEC	Test de Entrenamiento Circular
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Tx-100	Tritón X-100
UV	Luz ultravioleta
V	Voltios
Vm	Velocidad máxima (promedio por sesión)
Vp	Velocidad promedio total (de todas las sesiones)
Vps	Velocidad promedio (en una sesión)

## INTRODUCCION

**1.1. PLASTICIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

**1.2. COMPORTAMIENTO MOTOR Y LA PLASTICIDAD MOTORA**

**1.3. EL CUERPO ESTRIADO EN EL ESTUDIO DE LOS CAMBIOS  
PLASTICOS**

**1.4. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL CUERPO ESTRIADO**

**1.5. EL RECEPTOR COLINERGICO MUSCARINICO**

*«Danzamos alrededor de un círculo y  
hacemos suposiciones, pero el secreto está  
en el centro y posee el conocimiento»*

*Robert Frost*

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. PLASTICIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

#### 1.1.1. El Sistema Nervioso Central y los mecanismos plásticos

La evolución ha transformado al Sistema Nervioso Central (SNC) en una estructura de extraordinaria complejidad, capaz de realizar una notable diversidad de procesos.

El SNC presenta mecanismos que le permiten el control y ejecución de funciones vegetativas, la percepción y procesamiento de los estímulos sensoriales, la respuesta motora y las emociones, además de ser capaz de aprender y almacenar memoria. Para el desarrollo de estas funciones, el SNC requiere de una compleja organización que abarca desde el nivel molecular hasta la estructuración de divisiones citoarquitectónicas finamente correlacionadas. La cuantificación relativamente precisa de la red neuronal involucrada,  $10^{11}$  neuronas con aproximadamente  $10^4$  conexiones cada una, aporta una idea global del grado de integración requerido. Sin embargo, la existencia de semejante estructura es sólo parte de su potencialidad; el SNC también requiere una profunda **flexibilidad y mutabilidad en sus componentes** para adaptarse a la interacción con el entorno y para adquirir y procesar la nueva información.

El remodelamiento por la actividad funcional, la adaptación frente a los condicionamientos externos, es en gran medida la base del éxito evolutivo y condición necesaria para la implementación de funciones nerviosas de alta complejidad. Estos cambios, denominados **cambios plásticos**, flexibilidad o plasticidad, representan «la capacidad de las neuronas de modificar su función y de reemplazar, aumentar o disminuir el número de sinapsis en respuesta a un dado estímulo» (47), o «cualquier cambio persistente en las propiedades funcionales de una neurona o de un grupo neuronal» (294).

Aún sin ser definido como tal, el concepto de plasticidad se encuentra presente en la mente de los investigadores desde principios del siglo pasado. Las primeras especulaciones descritas en la literatura fueron realizadas por Spurzheim en 1815, quien suponía que al igual que los músculos, el cerebro podría modificar su tamaño por el ejercicio (287). En 1874 Charles Darwin escribía:

*«He demostrado que el cerebro de los conejos domésticos tiene un tamaño considerablemente reducido en comparación con el de los conejos silvestres o el de las liebres; y esto puede ser atribuido a que los conejos domésticos han sido confinados durante muchas generaciones, de manera que han desarrollado mucho menos su intelecto, su instinto, sus sentidos y sus movimientos voluntarios». (55)*

Aunque existieron estudios iniciales que vinculaban el tamaño del cerebro con la capacidad intelectual, gradualmente esta hipótesis fue abandonada. En su lugar se sugirió la existencia de factores más sutiles que involucraban cambios en las conexiones nerviosas y modificaciones químicas del cerebro por la actividad funcional. En 1895 Ramón y Cajal sostenía:

*«Uno puede suponer que el ejercicio cerebral, ya que no puede producir nuevas células (las células nerviosas no pueden multiplicarse como las células musculares), produce un desarrollo mayor al usual de las expansiones protoplásmicas y de las fibras nerviosas colaterales, forzando el establecimiento de conexiones intercorticales nuevas y más extendidas». (250)*

Posteriormente, Kohler en 1938, complementaba este concepto desde un punto de vista neuroquímico:

*«La pregunta no es si los eventos nerviosos modifican las características del tejido en que suceden. La única pregunta que puede ser aún debatida es si dichos*

*cambios, que indudablemente ocurren, mantienen la permanencia... De acuerdo a nuestro conocimiento actual el efecto primario que producen los impulsos nerviosos en las capas gangliónicas es la actividad química...» (158)*

Finalmente, los trabajos pioneros de Bennett y colaboradores, realizados entre 1962 y 1964, presentan las primeras evidencias de un efecto ambiental sobre la organización morfológica y neuroquímica del cerebro. En particular, observaron un aumento del grosor de la corteza somatosensorial, de la actividad de la acetilcolinesterasa, de hexoquinasas y de la concentración de serotonina en dicha región luego del emplazamiento de ratas adultas durante 80 días en un ambiente complejo y estimulante (20). Precisamente en estos trabajos se describe por primera vez el concepto de plasticidad cerebral. Los mismos investigadores, informaron que la corteza de los animales estimulados tenía un peso 10% mayor que la de los controles mantenidos en sus jaulas. Complementariamente, otros estudios sugirieron que estos cambios podrían estar asociados al recambio, eliminación y remodelación, de las conexiones sinápticas ya que comprobaron que, bajo el mismo diseño experimental, los animales estimulados presentaban un aumento del número total y la longitud de los segmentos terminales de las neuronas corticales piramidales ubicadas en las capas II y III (297). Poco tiempo después, otros investigadores demostraron que la actividad motora aumentaba el árbol dendrítico de las células de Purkinje (247).

Para la misma época en que se describían los primeros fenómenos plásticos, Hubel y Wiesel comenzaban sus investigaciones sobre fisiología de la corteza visual del gato (134), iniciando el desarrollo de lo que más tarde fue reconocido como el primer modelo, y hasta el momento más desarrollado, de plasticidad en el SNC. Estas investigaciones los condujeron finalmente a la obtención del Premio Nobel en 1981 por sus trabajos sobre la influencia del ambiente en el desarrollo y la plasticidad de la corteza visual (311). El modelo desarrollado, que se describe más adelante, permitió



una mayor comprensión acerca de la importancia de los mecanismos plásticos y de las características particulares de estos procesos durante el desarrollo postnatal.

### **1.1.2. Desarrollo de la plasticidad en el Sistema Nervioso Central**

El SNC de los mamíferos, que comienza a conformarse prenatalmente intraútero, muestra al nacimiento una considerable inmadurez y plasticidad. Pronto quedó claro que la plasticidad del SNC, presente durante toda la vida, es mayor durante el desarrollo y disminuye durante el envejecimiento. Este concepto concuerda con la observación general que demuestra que durante el desarrollo, la capacidad de regeneración y de adaptación es alta mientras que en el organismo envejecido los procesos neurodegenerativos progresan, a la par que decrecen las habilidades neurológicas superiores y la capacidad plástica del sistema.

La existencia de una **plasticidad máxima** durante el desarrollo otorga una ventaja evolutiva importante: confrontar y refinar su estructura en función de los estímulos postnatales, que obviamente difieren considerablemente de los prenatales, y que en última instancia representan una valoración más precisa de las exigencias a las que se verá expuesto el organismo durante su vida, permitiéndole una mejor adaptación. Bajo este punto de vista, es posible entender por qué las noxas que interfieren con el desarrollo normal del SNC pueden producir, en esta etapa, cambios permanentes y mucho más profundos que en el cerebro maduro.

Al analizar el desarrollo postnatal temprano, queda en evidencia que, si bien los mecanismos innatos proveen al SNC de una conexión altamente específica y compleja, la experiencia temprana de vida y la participación de los procesos plásticos resultan necesarios para mantener, refinar y completar el desarrollo. Durante los primeros estadios postnatales, interaccionan procesos que permiten combinar y modificar la organización estructural, celular y molecular desarrollada a partir de un programa prefijado, para adaptarlos a las condiciones del entorno.

En este sentido, en el desarrollo del SNC se reconocen **dos etapas** que pueden solaparse en tiempo y en espacio.

Una primera etapa, donde existe un **desarrollo genéticamente programado** del SNC. Incluye la proliferación y migración neuronal, la agregación celular selectiva, el establecimiento de la diversidad fenotípica (incluyendo las características morfológica y neuroquímicas, la adquisición de nuevas propiedades de membrana y la selección del tipo de transmisión sináptica) y la formación de patrones de conectividad general del SNC. Completando el refinamiento estructural del SNC, en esta etapa se ponen en funcionamiento fenómenos regresivos que incluyen la competencia por los factores tróficos, la eliminación de sinapsis y la muerte celular programada (50, 141, 156, 312).

La segunda fase que corresponde al **desarrollo funcional**, donde se resulta fundamental la interacción del organismo con su medio. La reorganización de las conexiones en función de la actividad. El factor ambiental en contraposición al factor genético. En este momento, el trazado organizativo general ya está establecido, pero ahora debe madurar: el refinamiento de formas, cantidad y distribución de células y moléculas, conjuntamente con el rearrreglo de sinapsis y ramificaciones, definen el patrón de conectividad. Finalmente, la densidad de neuroreceptores y neurotransmisores se ajustan y permiten la adaptación fina del sistema (83, 101, 189). Es en ésta segunda fase donde muestran mayor relevancia los eventos plásticos.

### **1.1.3. Modelos para el estudio de la plasticidad**

Si bien los mecanismos de plasticidad del SNC participan en diversos aspectos del funcionamiento nervioso, los procesos neuroquímicos subyacentes no se conocen en profundidad. Sin embargo, en las últimas décadas el desarrollo de distintos modelos experimentales favoreció el estudio de los mecanismos básicos operantes en los procesos plásticos.

Los modelos más amplios y descriptivos desarrollados en la investigación de la plasticidad del SNC involucran, casi invariablemente, el estudio de aspectos neuroquímicos y neuromorfológicos asociados al bloqueo de estímulos sensoriales. En estos modelos, se logró interferir con el establecimiento y refinamiento de los circuitos neuronales mediante una manipulación relativamente sencilla de la experiencia sensorial (eliminación, disminución).

El **sistema visual de mamíferos** ha sido extensamente estudiado como modelo de este tipo de plasticidad. Hubel y Wiesel, demostraron en experimentos con gatos y también con monos Rhesus, que la privación monocular por sutura de un ojo, generaba ceguera en el ojo privado de estimulación lumínica (135), y que para este efecto existía un período crítico. De esta manera, la ceguera se producía luego de la privación durante las primeras semanas del desarrollo postnatal pero no en animales adultos (176, 311). Posteriormente, el defecto visual debido a la privación fue correlacionado con una alteración de la organización estructural de la corteza visual (311). Distintos estudios complementarios, confirmaron la alteración morfológica de la arborización axónica en el núcleo geniculado lateral y de las arborizaciones tálamo-corticales (51, 87, 136).

Un segundo modelo corresponde al estudio de los cambios plásticos en las áreas sensoriales luego de la destrucción de las estructuras sensoriales aferentes. La denervación por seccionamiento del nervio, o lesión del receptor periférico del estímulo sensorial, produce profundos cambios citoarquitectónicos, somatotópicos y funcionales de las áreas corticales relacionadas (144, 283). En varios, Merzenick y sus colegas, evaluaron la representación en la corteza sensorial de las sensaciones táctiles de los dedos de la mano en la **corteza cerebral de primates** (200, 201). Sus descubrimientos muestran que a cada dedo le corresponde un área, pero que estos sectores no son estáticos y pueden cambiar su forma y características en función de la experiencia. Luego de la amputación de un dedo, por ejemplo, las aferencias de los restantes dígitos

se expanden gradual y constantemente, pero manteniendo las relaciones primarias. Esto fue observado con las aferencias de los dedos 2 y 4 tras la amputación del dedo del medio. Cuando la expansión se completa, la zona del cerebro que representa la superficie de la mano es proporcionalmente mayor, mientras que la representación de los dedos 2 y 4 se hizo más fina.

Por último, otro modelo de estudio de la plasticidad sensorial involucra la **corteza somatosensorial primaria de ratón** (202). Cada bigote del animal está representado en la corteza somatosensorial contralateral en una agregación neuronal independiente denominada «barril» (318), fácilmente visualizable histoquímicamente por la detección de citocromo oxidasa (168). Los experimentos de denervación de estas estructuras muestran alteraciones del neuroreceptor colinérgico muscarínico, de las sinapsis gabaérgicas y de la actividad de acetilcolinesterasa (94, 202).

En conclusión, las investigaciones en los distintos modelos de plasticidad sensorial demuestran que la pérdida o disminución de la funcionalidad de las estructuras sensoriales, de las vías aferentes, o de ambas, conduce a alteraciones neuroquímicas y morfológicas notorias.

#### **1.1.4. Estimulación motora y plasticidad motora**

El estudio del efecto de la estimulación sensorial en la plasticidad del SNC ha sido posible en gran medida gracias a la relativa facilidad de manipulación de la experiencia visual y de disección y análisis del sistema visual. Sin embargo, existen otros tipos de estimulación de mayor complejidad y del mismo o mayor interés, como es la estimulación motora. El estudio de plasticidad frente a la estimulación motora incorpora el análisis de estructuras nerviosas involucradas en la respuesta del SNC, las eferencias y no sólo las aferencias como en los sistemas sensoriales. Por otra parte el sistema motor presenta características de integración y funcionamiento de nivel superior al sistema visual. Debido a la complejidad del manipuleo y análisis de la

experiencia motora, no existen prácticamente modelos de investigación que permitan el abordaje del estudio de la plasticidad motora en el SNC.

En este campo, podría volver a nombrarse los estudios de la **corteza cerebral de primates** amputación de los dígitos en primates (200, 201) ya que en realidad intervienen tanto procesos nerviosos sensoriales como motores, asociados al movimiento de los dedos. De todos modos, el componente principal es la eliminación del estímulo sensorial y la utilización de este diseño para interpretar los mecanismos relacionados con la plasticidad motora son difícilmente evaluables.

En segundo lugar, un sistema útil para la evaluación de la plasticidad motora es el estudio de la **unión neuromuscular**. Bajo este diseño experimental han sido estudiados diversos aspectos de la plasticidad sináptica asociada con la inervación muscular. Purves y Lichtman realizaron trabajos donde analizaron los mecanismos de competencia entre las fibras axónicas que regulan el número y distribución de las sinapsis luego de la denervación muscular (246). De este modo, comenzó a comprenderse los eventos neuroquímicos y neurofisiológicos que participan en la determinación del patrón de conectividad sináptica. Recientemente, Colman y colaboradores, estudiando la inervación del músculo trapezoidal del ratón, comprobaron la existencia de cambios específicos que preceden la eliminación de una sinapsis (44). Las fibras musculares, temporalmente inervadas en forma simultánea por dos axones, mostraron un patrón electrofisiológico similar al principio, de acuerdo a los registros intracelulares. En forma posterior, ambas uniones comenzaron a diferenciarse.

La conexión que finalmente sobrevivió, aumentó su fortaleza sináptica mediante el incremento de la cantidad de neurotransmisor liberado. La otra fue tornándose más débil debido a una reducción del cuanto de liberación de neurotransmisor y una disminución en la densidad postsináptica del receptor. Finalmente fue eliminada.

Estos experimentos aportan información que permite relacionar los cambios en el disparo neuronal con cambios a largo plazo que afectan el patrón de conectividad del sistema nervioso de mamíferos.

Aunque representa el análisis de los mecanismos intervinientes en el Sistema Nervioso Periférico, resulta ser un modelo adecuado para interpretar los eventos que participan en el reemplazo sináptico. Estas y otras investigaciones permitieron comprender que los procesos son similares en el SNC (46).

Si bien la extrapolación no puede hacerse en forma directa, los trabajos citados proveen herramientas para entender y dirigir la investigación de la plasticidad motora del SNC.

#### **1.1.5. Los mecanismos plásticos y la importancia de los neuroreceptores**

Desde la primera identificación de los neuroreceptores, rápidamente fue reconocida la importancia fundamental de estas moléculas en la regulación de la eficacia de la neurotransmisión y del procesamiento de la información nerviosa. La manipulación farmacológica con agonistas y antagonistas de los distintos neuroreceptores permite describir, a través de la activación o bloqueo, respectivamente, el papel crítico que estas moléculas desempeñan en los más variados procesos nerviosos.

La gran diversidad de tipos y subtipos de neuroreceptores y la amplia gama de eventos intracelulares a los que pueden acoplarse, permiten pensar en los neuroreceptores como una variable indispensable para interpretar molecularmente las diversas funciones del SNC (278). Fisiológicamente además, los neuroreceptores pueden ser rápidamente regulados en cantidad y en actividad, permitiendo modificar la respuesta neuronal frente a los más variados estímulos externos. La diversidad y la capacidad de regulación por la actividad, son dos características que le otorgan a los neuroreceptores un papel principal como eje molecular de regulación durante los distintos procesos plásticos.

### **1.1.6. Importancia del estudio de la plasticidad durante el desarrollo**

Distintos estudios, principalmente los realizados en la vía visual, muestran claramente que la plasticidad durante el desarrollo presenta características únicas que lo diferencian de la plasticidad del cerebro maduro. La investigación de los mecanismos plásticos durante el desarrollo presenta, así, una importancia adicional debido a su capacidad de intervenir en alteraciones mucho más profundas de la neuroquímica y la estructura del SNC. Las consecuencias de la interferencia de los mecanismos plásticos durante las primeras etapas de la vida postnatal puede acarrear consecuencias graves e irreversibles como demuestra la observación de diversas alteraciones funcionales por el efecto de la administración de agentes químicos (260, 261, 288). La respuesta plástica diferencial de este período es indicadora, también, de la presencia de ciertas características distintivas que no se encuentra presente en otras etapas de la vida postnatal, y por lo tanto, sólo pueden estudiarse durante el desarrollo.

Por otra parte, la capacidad de generar cambios permanentes durante el desarrollo del SNC no sólo debe evaluarse como un riesgo potencial sino que ofrece, a su vez, la posibilidad de utilizar dicho período para revertir, definitivamente, alteraciones preexistentes en el organismo. La oportunidad de utilizar este período de sensibilidad para mejorar, mediante la estimulación nerviosa, la funcionalidad del SNC resulta promisorio. De hecho, la estimulación temprana es una práctica médica utilizada para revertir déficits motores aunque, desconociéndose los fundamentos neuroquímicos subyacentes, representa una metodología fundamentalmente empírica.

Desde el mismo punto de vista, la exposición a fármacos y otros elementos químicos durante el desarrollo puede ser evaluado como un factor beneficioso y abre la posibilidad de nuevas aplicaciones terapéuticas (175). En los dos casos, tanto para evitar consecuencias desfavorables como para revertir alteraciones previas, es imprescindible la comprensión de los mecanismos plásticos presentes durante el desarrollo.

## 1.2. COMPORTAMIENTO MOTOR Y PLASTICIDAD MOTORA

### 1.2.1. Significado del estudio del comportamiento motor

Un eje principal de las investigaciones en neurobiología corresponde al estudio del comportamiento motor. A partir de distintas metodologías experimentales, la ciencia intenta descubrir el fundamento neuroquímico subyacente al control normal de la actividad motora, como así también la comprensión de las distintas fisiopatologías motoras. El primer paso exitoso en pos de dicho objetivo, fue la explicación neuroquímica de las distintas disquinesias (e.g. enfermedad de Parkinson, corea de Huntington). Si bien no es completa y puede ser aún profundizada en gran medida, permitió relacionar por primera vez una estructura nerviosa particular, en este caso los ganglios basales, con una patología determinada del SNC (236).

Independientemente del éxito de estas investigaciones, la comprensión de las bases neuroquímicas del comportamiento motor también resulta de interés clínico. Distintos estudios, por ejemplo, presentan evidencias de que una mayor actividad física se relaciona con un mejor mantenimiento de las funciones cognitivas, incluyendo los procesos de memoria (42, 68, 72, 79, 95, 192). También que el entrenamiento físico mejora el estado psiquiátrico (25, 183) y previene la disminución de las funciones cognitivas por el envejecimiento (24, 262). Dentro del mismo campo, estudios experimentales en animales demuestran que la actividad motora puede modificar distintos sistemas de neurotransmisión. Puede revertir la caída de la función dopaminérgica relacionada con el envejecimiento (95, 193) y también modificar los niveles del receptor colinérgico muscarínico en hipocampo (80) y del dopaminérgico en cuerpo estriado (93).

No obstante estos resultados, los procesos plásticos desencadenados por la actividad motora aún están muy lejos de ser dilucidados. El desciframiento de las funciones motoras normales necesita de un análisis más profundo para comprender los



mecanismos celulares y moleculares intervinientes. La búsqueda de estrategias preventivas y correctivas de las diversas patologías motoras, neurodegenerativas y de la alteración por envejecimiento de las funciones nerviosas superiores también lo requiere, ya que en ambos tipos de procesos, normales y patológicos, la plasticidad motora desempeña un papel fundamental.

### **1.2.2. Inducción de mecanismos plásticos por la actividad motora**

Si bien las transformaciones neuroquímicas involucradas en los procesos plásticos distan mucho de ser comprendidas en su totalidad, nuevas conclusiones han sido aportadas a partir del estudio de la actividad física.

Además de los cambios ya mencionados sobre los sistemas de neurotransmisión, estudios recientes demostraron la inducción en el hipocampo, por el entrenamiento físico, de dos factores tróficos, el NGF y el BDNF (213, 214). Estos factores tróficos están asociados con distintos mecanismos plásticos (291), en particular con el reciclaje de neurotransmisores (5, 221, 273) y el crecimiento neuronal (59, 221). Por otro lado, también fue descrita la regulación de la expresión de las mencionadas moléculas por la actividad neuronal (26, 114, 325) y resaltada la importancia de dicha actividad neuronal, a través de los sistemas de neurotransmisión, en los mecanismos plásticos y en la determinación de los patrones de conectividad que determinan la funcionalidad del SNC (83, 101, 189, 291). De esta manera, la actividad motora parece capaz de desencadenar los distintos mecanismos de plasticidad a partir de la activación neuronal de las vías nerviosas involucradas.

### **1.2.3. Pruebas para el análisis del comportamiento**

En los estudios de plasticidad sensorial, los cambios morfológicos y neuroquímicos son evaluados a partir de la modificación de un estímulo sensorial particular (e.g. estimulación lumínica y plasticidad visual); análogamente, la plasticidad motora requiere el empleo y manipulación de una estimulación motora. En realidad, la

estimulación motora es una variable mucho más compleja y una gran variedad de pruebas motoras han sido desarrolladas para el estudio de esta actividad (92). Dichas pruebas han sido categorizadas de acuerdo a las funciones cerebrales que están involucradas mayoritariamente en cada tarea particular (e.g. aprendizaje asociativo y de habilidades motoras, funciones sensoriales, nivel de actividad, respuestas farmacológicas). Las pruebas motoras pueden clasificarse en pruebas apicales y no apicales (303).

Las pruebas no apicales se centran en la evaluación de comportamientos específicos que reflejan la función de un área particular del cerebro. En muchos casos estos comportamientos son innatos y estereotipados. Por el contrario, en las pruebas apicales intervienen varias regiones cerebrales. Las pruebas apicales involucran distintos tipos de aprendizaje y funciones sensoriales, así como el desarrollo de habilidades motoras. Por lo tanto, el SNC debe integrar, funcionalmente, distintas estructuras nerviosas para el desarrollo exitoso de la prueba.

#### **1.2.4. Estudio del comportamiento motor**

Las pruebas utilizadas para el estudio del comportamiento motor deben presentar ciertas características (32, 92, 303). La prueba ideal debería considerar: (a) la medición cuantitativa del cumplimiento de la prueba, (b) la presencia de distintos procesos neuronales superiores (e.g. aprendizaje asociativo, destreza motora) debe ser evaluada, preferentemente, en forma independiente o bajo distintas variables, (c) la prueba debe ser objetiva y reproducible y por lo tanto independiente del experimentador. Desde este punto de vista, la implementación de procedimientos automáticos de análisis, cuantificación y recolección de datos resulta aconsejable; (d) la duración de la prueba debe ser lo suficientemente extensa, más de 10 minutos, para minimizar los factores emocionales y exploratorios innatos. En contraparte, es aconsejable que no exceda los 30 minutos para minimizar los efectos del agotamiento físico y pérdida de la motivación por la actividad, (e) la prueba debería ser capaz de estudios longitudinales en el mismo animal, por lo tanto, las pruebas apicales deberían ser no-invasivas en

naturaleza. Para este último caso, obviamente, corresponde evaluar los objetivos de la prueba.

Otra característica valiosa de estas pruebas es que la respuesta comportamental induce una actividad neurofisiológica mensurable. De este modo, el comportamiento motor puede ser correlacionado con parámetros neuroquímicos y neurofisiológicos. Esta asociación entre la respuesta comportamental y los procesos neurofisiológicos permite abordar el aspecto neuroquímico del comportamiento y la plasticidad motora desde un punto de vista cuantitativo.

#### **1.2.4.1. El entrenamiento rotatorio y la inducción de cambios plásticos**

El **comportamiento rotatorio** en animales, el giro sobre sí mismo, ha despertado gran interés y ha sido extensamente estudiado en ratas y ratones. La actividad rotatoria que es parte del comportamiento motor normal (7, 96, 97), puede ser inducida por la administración de 6-hidróxidopamina que destruye en forma específica las proyecciones dopaminérgicas de la sustancia nigra al cuerpo estriado (125, 295, 302). Experimentaciones farmacológicas con agonistas y antagonistas dopaminérgicos han permitido confirmar la función de estas dos estructuras y de las vías dopaminérgicas en el comportamiento motor (41, 96, 302). Por otra parte, a partir de lesiones de las vías nigroestriatales, fueron estudiados los mecanismos plásticos que se disparan en el cuerpo estriado luego de la desaferentación. Estas alteraciones involucran cambios en la densidad y en los niveles de expresión de los neuroreceptores dopaminérgicos (248). Estos resultados permitieron utilizar al comportamiento rotatorio como un modelo para el estudio neuroquímico de la actividad motora (258). Es interesante notar, además, que alteraciones neuroquímicas de este tipo están involucradas en diversos procesos motores fisiopatológicos como la enfermedad de Parkinson, corea de Huntington y disquinesia tardía (236).

Análogamente, el empleo de una prueba donde los animales realizan una actividad circular en un disco, permitió obtener resultados y conclusiones similares (321). El **comportamiento circular condicionado** (a través de un aprendizaje y sin mediar ningún tipo de lesión o tratamiento farmacológico) induce cambios en el metabolismo de la dopamina en el cuerpo estriado (321, 324), activación de la tirosina-hidroxilasa (211) y el disparo de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (60).

Por todo lo expuesto, el comportamiento circular resulta ser un modelo biológico útil para el estudio neurofisiológico y neuroquímico de las funciones motoras. Además, la sistematización de un test de entrenamiento circular en nuestro laboratorio demostró, mediante el uso de drogas de reconocido efecto sobre el SNC, que el TEC es una prueba motora que sirve específicamente para la evaluación de plasticidad en las estructuras nerviosas involucradas en el comportamiento motor (31, 32).

#### **1.2.4.2. El test de entrenamiento circular (TEC)**

El TEC es un modelo de comportamiento condicionado operante en el cual ratas privadas de agua son entrenadas para correr en círculo en una dirección pre-establecida (giro hacia la derecha o hacia la izquierda), en busca de una recompensa de agua. Este modelo fue inicialmente desarrollado para el estudio del metabolismo dopaminérgico involucrado en la actividad motora (321) y permite evaluar no sólo la actividad motora *per se*, sino también la importancia de la lateralidad cerebral en la función motora y el aprendizaje asociativo. Por otra parte, esta prueba cumple con las distintas características relacionadas con las pruebas apicales que fueron descritas anteriormente. Al cuantificar el número de vueltas y la velocidad de cada animal durante una sesión, el TEC permite evaluar la destreza motora. También, y precisamente por ser una prueba condicionada con participación de un aprendizaje asociativo, el TEC permite evaluar esta variable en base a la cuantificación del número de errores (giros en el sentido no recompensado). Es importante agregar que en esta prueba conductual también deben considerarse los procesos nerviosos relacionados con

la recompensa y la motivación. De este modo, el TEC permite estudiar diversos aspectos de la plasticidad del SNC: la plasticidad motora y la plasticidad relacionada con el aprendizaje, la memoria y la motivación.

#### **1.2.4.3. El test del disco giratorio (TDG)**

Las ratas colocadas en una plataforma en movimiento desarrollan un patrón de actividad locomotora voluntaria, independiente de una recompensa. Esta observación ha dado lugar al diseño de distintas estructuras capaces de cuantificar y estudiar este comportamiento. El uso del disco giratorio con este propósito fue descrito por primera vez por Richter y Wang en 1926 (255). El TDG, como se utiliza en el presente trabajo, es un modelo de entrenamiento no condicionado. Consiste en una plataforma giratoria donde el animal es ubicado y como respuesta al movimiento giratorio del piso, corre sobre el disco siguiendo el recorrido circular en sentido contrario al del giro. El TDG presenta características muy similares al TEC con la excepción de la ausencia de un comportamiento condicionado y por lo tanto permite el estudio de la plasticidad motora independientemente de la plasticidad relacionada con el aprendizaje asociativo y la motivación por la recompensa.

### **1.3. EL CUERPO ESTRIADO EN EL ESTUDIO DE LOS CAMBIOS PLASTICOS**

#### **1.3.1. Elección del cuerpo estriado**

El comportamiento motor es un proceso complejo donde intervienen distintas estructuras del SNC en una complicada integración espacial y temporal. El estudio conjunto de las distintas estructuras involucradas es, desde todo punto de vista, imposible de realizar. Como en todo modelo de investigación, la segmentación de una parte de la naturaleza se hace necesaria para la evaluación e interpretación del fenómeno en estudio. En este aspecto, el cuerpo estriado presenta características que permiten, aún segmentando el área de análisis, mantener en estudio las diversas y

numerosas variables que participan del comportamiento motor. Como se verá a continuación, en el cuerpo estriado, componente principal de los ganglios basales, se encuentran presentes los distintos mecanismos de plasticidad que fueran indicados en el primer capítulo.

Si bien los ganglios basales no tienen acceso directo a las neuronas motoras de la médula espinal, representan una etapa fundamental en la regulación de la actividad motora. Su ubicación y su estructuración particular le permite actuar junto con la corteza cerebral en la ejecución de diversas funciones nerviosas, no sólo de la respuesta motora. Precisamente, entre las discusiones actuales se encuentra la controversia sobre la participación de los ganglios basales, en particular el cuerpo estriado, en funciones motoras y cognitivas (45, 197, 224).

El estudio del cuerpo estriado se ha convertido, así, en uno de los temas de investigación más importantes y más citados en neurobiología (108), ya que permite el abordaje de cuestiones de amplia implicancia. Dentro del perfil del presente trabajo, el cuerpo estriado sirve como un modelo para el estudio de la neuroquímica de la función motora, la neuroplasticidad y los procesos comportamentales complejos asociados a la actividad funcional generada en los animales.

### **1.3.2. El cuerpo estriado y la actividad motora**

La participación del cuerpo estriado en la actividad motora fue señalada por primera vez tras ser descubierto que las lesiones en esta estructura producían alteraciones en los movimientos físicos en seres humanos. La primera de estas observaciones fue realizada por Kinnier Wilson en 1912, quien comprobó que el desarrollo de movimientos anormales involuntarios (disquinesias) se debía a la lesión de la mencionada área cerebral en la enfermedad que lleva su nombre, también denominada degeneración hepatolenticular (150). Otras patologías motoras (e.g. enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, etc) incluyen siempre serios trastornos del cuerpo estriado (4, 38, 236,

310). Precisamente, gran parte del interés en el estudio de los ganglios basales y en su componente principal, el cuerpo estriado, nació del desciframiento de las alteraciones estructurales y funcionales encontradas en el cuerpo estriado en las neuropatías motoras recién citadas. La corea de Huntington, por ejemplo, está caracterizada por la pérdida de neuronas estriatales eferentes e intrínsecas, mientras que la bradiquinesia propia de la enfermedad de Parkinson, que representa la patología motora opuesta, esta relacionada con la degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal. Los movimientos coreicos fueron descritos por Kinnier Wilson como procesos motores normales, pero fragmentados debido a la incapacidad de mantener la actividad motora en marcha y suprimir al mismo tiempo los movimientos no deseados (150).

La bradiquinesia, por el otro lado, está vinculada con la sobreactividad de los circuitos facilitadores primarios con inadecuada inhibición de la modulación del comportamiento en ejecución por la vía dopaminérgica nigroestriatal (236). En todos los casos está demostrada la alteración celular y neuroquímica del cuerpo estriado como causa principal.

Desde el campo farmacológico, también se aportaron pruebas de la vinculación del cuerpo estriado con el control de la actividad motora. Por un lado, se observó la inducción de disquinesias durante el tratamiento clínico con fármacos que actuaban sobre el cuerpo estriado o la vía nigroestriatal como la levodopa (15) y los antipsicóticos (14). Evidencias similares fueron obtenidas luego de la lesión experimental del cuerpo estriado con ácido caínico (64) o con ácido quinolínico (218). Complementariamente, otros investigadores evaluaron el efecto de la lesión unilateral de la vía nigroestriatal sobre el comportamiento motor. La destrucción electrolítica (280) o farmacológica (96) de esta vía generaba un comportamiento rotacional relacionado con el mantenimiento asimétrico del control del movimiento.

Desde otra perspectiva, el cuerpo estriado también demuestra su papel singular en la regulación de la actividad motora dado que es el blanco principal de la acción

Los estudios en el cuerpo estriado muestran que esta estructura es crítica para la adquisición de habilidades que requieren la generación de programas que guíen su realización.

Los pacientes con corea de Huntington, una enfermedad que produce degeneración progresiva del cuerpo estriado, presentan déficits en el aprendizaje de tareas motoras de rotación (36) y visuoperceptuales (235). Trastornos similares fueron observadas en pacientes recuperados de una hemiparesis por infarto primario de los ganglios basales (245) y también se detectaron anomalías en el cuerpo estriado por análisis con resonancia magnético-nuclear en pacientes con disquinesia tardía, quienes presentaron un bajo nivel de aprendizaje de actividades motoras (102).

Nuevas evidencias, obtenidas en experimentaciones con ratas, indican que el daño del cuerpo estriado impide el aprendizaje de evitación que implica moverse al otro lado de un ambiente para evitar un shock eléctrico (67). Los animales también muestran falencias para aprender a girar en una determinada dirección a fin de obtener un refuerzo alimenticio (149). Otros experimentos demostraron la disociación del aprendizaje de habituación, la formación de una preferencia condicionada y el aprendizaje relacionado a un estímulo en ratas con lesiones electrolíticas o neurotóxicas en el cuerpo estriado (199).

De todas maneras, el daño del cuerpo estriado no afecta otros tipos de aprendizaje, como el aprendizaje asociativo relacionado con el hipocampo (198). En este sentido, estudios experimentales en animales y la evaluación en seres humanos muestran la existencia de dos sistemas independientes de aprendizaje. El hipocampo y las estructuras anatómicamente relacionadas participan en el aprendizaje que requiere memoria espacial y relacional; mientras que el cuerpo estriado participa en el aprendizaje motor y en el aprendizaje de habituación no motor que requiere una capacidad asociativa de incrementación gradual (157, 198).



#### **1.3.4. Mecanismos de recompensa y motivación**

Toda prueba comportamental condicionada, no sólo involucra mecanismos de aprendizaje sino también procesos vinculados con la recompensa y motivación. El cuerpo estriado es una estructura relacionada con la motivación a través de su participación en el sistema límbico (257). Por ejemplo, existen evidencias que indican que el efecto del estímulo condicionado en la motivación comportamental durante una prueba de entrenamiento, depende de la interacción del sistema glutamatérgico (receptor NMDA) y dopaminérgico en el cuerpo estriado y su conexión con los núcleos amigdalinos (256). Otros investigadores confirmaron la importancia del cuerpo estriado en estos procesos, al estudiar ratones transgénicos con déficits en el funcionamiento de esta estructura (320). También se realizaron investigaciones en monos, donde se comprobó que los mecanismos de recompensa y motivación están correlacionados con la actividad neuronal del cuerpo estriado y la vía nigroestriatal (6, 279, 314).

#### **1.3.5. El cuerpo estriado, los mecanismos plásticos y su importancia clínica**

Además de la importancia del estudio del papel que desempeña el cuerpo estriado en los procesos motores, cognitivos y motivacionales normales, esta estructura presenta una particular relevancia clínica. El cuerpo estriado es el centro de distintos desórdenes neuropsiquiátricos que involucran degeneraciones cognitivas y motoras: Además de ser un blanco farmacológico por excelencia, debido a la alta concentración de neuroreceptores, el cuerpo estriado se ve afectado por distintas drogas de abuso, como la cocaína, la morfina y la Anfetamina (105, 190, 207, 324). Estas drogas generan profundos cambios a nivel postranscripcional y en la expresión genética de las neuronas estriatales, lo que indicaría la activación de los mecanismos plásticos del cuerpo estriado (160, 216). La cocaína, por ejemplo, afecta la liberación y recaptación de los neurotransmisores catecolaminérgicos (161). Más importante aún es el efecto sobre el c-fos y el JunB. Mediado por la activación de los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos en el cuerpo estriado, tanto la cocaína, la morfina, como las

anfetaminas disparan la expresión de estos dos proto-oncogenes (105, 190, 207, 324), los que a su vez están involucrados con una amplia variedad de respuestas plásticas en el cuerpo estriado (251, 267). Todos estos experimentos en conjunto presentan al cuerpo estriado como un nuevo modelo para el estudio de los mecanismos intracelulares que subyacen a los cambios plásticos neuronales, lo que sugiere nuevas aproximaciones para comprender el efecto de las drogas de abuso.

También los neurofármacos están fuertemente relacionados con estos mecanismos. Los citados compuestos son drogas utilizadas para controlar distintas afecciones neurológicas. Precisamente el cuerpo estriado, por su participación en los distintos desórdenes neurodegenerativos, es un blanco principal de los mismos. El efecto de estas drogas sobre los mecanismos plásticos del cuerpo estriado son importantes para la comprensión, control y prevención de las distintas afecciones. Los amplios estudios realizados sobre el efecto del haloperidol, un neuroléptico potente utilizado como antipsicótico, son un ejemplo claro del efecto de estas drogas sobre la plasticidad del cuerpo estriado. En efecto, distintas publicaciones muestran el desarrollo de hipersensibilidad a agonistas dopaminérgicos y cambios de la plasticidad sináptica y morfológica debido al haloperidol en el cuerpo estriado y en otras áreas cerebrales (148, 155).

Conjuntamente con el empleo de la farmacología para el tratamiento de afecciones neurológicas que involucran al cuerpo estriado, recientemente se ha implementado una segunda estrategia totalmente distinta pero donde también intervienen los procesos plásticos, el trasplante neuronal y la regeneración nerviosa (77). También en este caso, el circuito nigroestriatal es un blanco particularmente investigado mediante esta metodología (187). El éxito clínico en este campo está relacionado con el análisis de estrategias que combinen distintos tratamientos con la activación de rutas que aumenten la eficiencia de reparación del daño causado por las distintas neuropatías. Para resolver esta problemática compleja, es necesario tener en cuenta cada refinamiento en nuestro

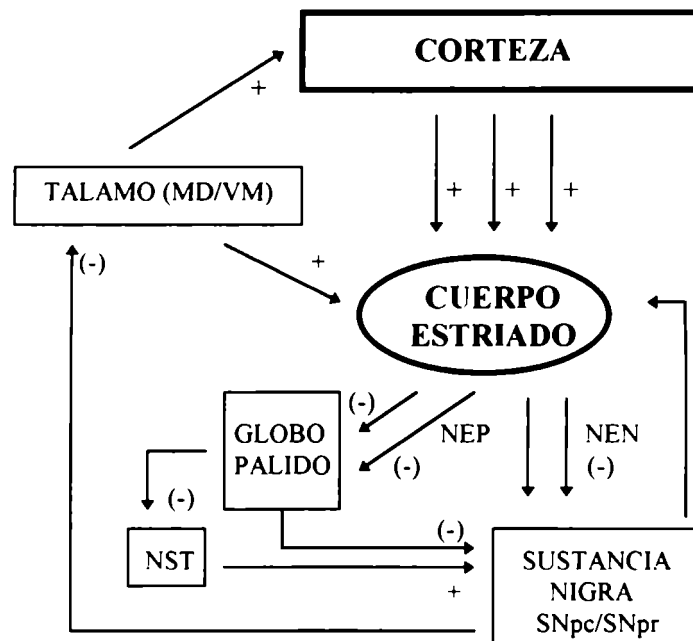
conocimiento de los circuitos neuronales, arquitectura funcional y mecanismos plásticos del cuerpo estriado.

## 1.4. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL CUERPO ESTRIADO

### 1.4.1. Anatomía funcional y organización estructural

La estructura anatómica-funcional y la organización interna del cuerpo estriado ha sido extensamente descrita en ratas, gatos, monos y seres humanos (90, 91, 233). El cuerpo estriado, conformado por el **núcleo caudado** y el **putamen**, es la estructura más importante y prominente de los ganglios basales. Junto con el globo pálido (paleostriado), la amígdala o núcleos amigdalinos (arquistriado) y el núcleo subtalámico, conforma los ganglios basales. Morfológicamente, el cuerpo estriado es una estructura alargada con una cabeza piriforme que se continúa por un extremo delgado, prolongado caudoventralmente.

Sus principales conexiones se diagraman en la figura 1. Recibe sus aferencias principalmente de la corteza cerebral y representa la primera etapa en la trasposición del mapa funcional cortical a los ganglios basales. Virtualmente todas las áreas funcionales corticales (incluyendo áreas motoras, sensoriales, asociativas y límbicas) participan con distinto grado de proyecciones, donde la contribución de la corteza sensorimotora es particularmente importante y menos trascendencia presenta la corteza visual (65, 123, 147, 165, 227, 249, 269). Las **proyecciones corticoestriatales** que desde el punto de vista de la neurotransmisión son fibras glutamatérgicas excitatorias, se originan en neuronas que se encuentran tanto en las capas supragranulares como en las infragranulares (143, 152, 227, 266). La contribución relativa de las neuronas dentro de cada capa varía de acuerdo al sitio de proyección dentro del cuerpo estriado. Las neuronas corticales que se proyectan bilateralmente son pocas comparadas con el número de neuronas que lo hacen ipsilateral o contralateralmente (78, 164).



**FIGURA 1. Representación esquemática de las conexiones del cuerpo estriado.** La corteza envía proyecciones glutamatérgicas excitatorias a las neuronas gabaérgicas proyectivas del cuerpo estriado (espinosas medianas), las cuales pueden clasificarse en dos tipos diferentes de acuerdo a sus sitios de proyección. Neuronas estriatopalidales (NEP) y neuronas estriatonigrales (NEN), que proyectan al globo pálido y a la sustancia nigra, respectivamente. En ambos casos utilizan GABA como neurotransmisor (transmisión inhibitoria). Tanto las NEP como las NEN presentan una distribución homogénea a lo largo de todo el cuerpo estriado. Las NEN, sin embargo, se subdividen en aquellas que proyectan a la sustancia nigra pars compacta (SNpc) o a la sustancia nigra pars reticulata (SNpr). Además, las neuronas gabaérgicas del globo pálido aportan proyecciones inhibitorias al núcleo subtalámico (NST) y a la Snpr. Por su parte, la sustancia nigra envía proyecciones dopaminérgicas inhibitorias al tálamo (en particular a los núcleos dorsomediales y medioventrales), el cual envía fibras glutamatérgicas excitatorias a la corteza cerrando el circuito. Finalmente, a través de fibras dopaminérgicas la sustancia nigra ejerce una acción reguladora sobre el cuerpo estriado actuando sobre los receptores dopaminérgico D1 y D2. Mientras que el tálamo le envía proyecciones glutamatérgicas.

Del cuerpo estriado salen dos vías eferentes gabaérgicas inhibitorias principales, las **fibras estriatonigrales** que conectan directamente con la sustancia nigra pars reticulata y pars compacta y las **fibras estriatopalidales**, que conectan con el globo pálido. A través

del globo pálido se produce una conexión con la sustancia nigra pars reticulata, en forma directa o haciendo escala en el núcleo subtalámico. El circuito funcional se cierra con las proyecciones desde la sustancia nigra pars reticulata al tálamo, por las proyecciones del globo pálido a los núcleos anteroventral, lateroventral y centromediano del tálamo y la proyección tálamo-cortical por un lado, y por otro con la regulación inversa nigroestriatal de fibras dopaminérgicas, desde la sustancia nigra pars compacta nuevamente al cuerpo estriado (90, 91, 233). Estas son las principales proyecciones de los circuitos donde interviene el cuerpo estriado aunque no representa una descripción exhaustiva. Existen otras conexiones menores como las eferencias nigrotalámicas que, conectadas con el núcleo intralaminar, realizan retroalimentación sobre el cuerpo estriado (90), o las interconexiones entre los cuerpos estriados derecho e izquierdo (233).

A medida que se progresó en el conocimiento del cuerpo estriado se hizo evidente la existencia de una particular organización estructural. Desde la primera interpretación de las fibras corticoestriatales se consideró que cada área cortical proyecta con una estricta topografía sobre el cuerpo estriado (147). Una de las características de la organización de las proyecciones corticoestriatales es la demostración que las áreas corticales asociativas, sensorimotoras y límbicas proyectan en forma segregada a distintas regiones del cuerpo estriado, referidas como **territorios estriatales asociativos, sensorimotores y límbicos**, respectivamente (232). Esta parcelación indica una organización espacial del procesamiento de la información que recibe el cuerpo estriado.

Finalmente, otra característica importante de la organización del sistema corticoestriatal está determinado por la particular heterogeneidad del cuerpo estriado que muestra una estructura interna subdividida en dos áreas distintas: la **matriz** y los **estriosomas** (o parches). Si bien no representan compartimientos independientes, ambas estructuras se diferencian entre sí por la desigual distribución de distintos neuropéptidos y enzimas

vinculadas con la metabolización de distintos neurotransmisores (90, 104). Esta distribución en matriz y parches, al que se le denominó mosaico es de importancia funcional ya que las distintas aferencias, eferencias y conexiones internas mantienen una distribución particular en referencia a estas estructuras (88, 89, 90, 91, 233).

Por ejemplo, esta organización está asociada a una segregación particular de neuronas eferentes, así como de proyecciones aferentes; en particular para la interacción nigroestriatal. Estudios realizados en ratas mediante transporte retrógrado demostraron que las proyecciones estriatales a la sustancia nigra son diferentes. Las neuronas gabaérgicas de los estriosomas proyectan a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y pars reticulata, mientras que las neuronas gabaérgicas de la matriz lo hacen sobre las neuronas gabaérgicas de la sustancia nigra pars reticulata. Por lo general, además, la arborización dendrítica de las neuronas proyectivas se mantiene restringida mayoritariamente al compartimiento correspondiente a la célula de origen.

Por otra parte, el sistema aferente también presenta una organización similar. Las aferencias dopaminérgicas sobre la matriz provienen de un grupo de neuronas localizadas en el área tegmental ventral, la zona dorsal de la sustancia nigra pars compacta y el área retrorubral. Las neuronas dirigidas sobre los estriosomas, en cambio, se originan de la zona ventral de la sustancia nigra pars compacta y de islas dopaminérgicas presentes en la sustancia nigra pars reticulata. Del mismo modo, las proyecciones corticoestriatales terminan en formas agrupadas de diferente tamaño, con una organización que se correlaciona con la distribución de los dos compartimentos.

#### **1.4.2. Tipos neuronales**

El conocimiento de la organización intrínseca del cuerpo estriado es obviamente un requisito necesario para entender la neurobiología de los procesos en que este núcleo participa. Existen diferentes tipos de neuronas estriatales. Como los principales núcleos nerviosos, el cuerpo estriado está compuesto por neuronas proyectivas (células Golgi tipo I) e interneuronas locales (células Golgi tipo II). Sin embargo, a diferencia de la

mayoría de las estructuras, las neuronas proyectivas presentan una relación mucho mayor respecto a las interneuronas, en una relación 9:1 en ratas y 3:1 en primates (103). Las neuronas proyectivas del cuerpo estriado representan el 90% de las neuronas de esta estructura. Con un diámetro de 12-20  $\mu\text{m}$ , dichas células irradian 4 a 5 dendritas primarias que se adelgazan y presentan una gran cantidad de especializaciones de la membrana conocidas como espinas dendríticas; se denominan neuronas espinosas medianas (313). Su axón crece a partir del cuerpo neuronal o del sector proximal de un tronco dendrítico y emite varias fibras colaterales antes de dejar la vecindad del cuerpo neuronal. Estas fibras colaterales se arborizan abundantemente de acuerdo a dos patrones definidos (145). El patrón más común consiste en la arborización axonal restringida al dominio dendrítico propio de la célula de origen o, a lo sumo, a las neuronas vecinas. Los colaterales forman sinapsis con sus propias dendritas (autapsis) o dendritas de otras neuronas proyectivas vecinas. La arborización resultante permite participar a las neuronas proyectivas en los circuitos internos del cuerpo estriado (234). Un segundo patrón de arborización, menos común, consiste en una arborización mayor y más extensa que va más allá de la vecindad de la neurona de origen y que comunmente no interacciona con la célula originaria (145).

Virtualmente todas las **neuronas espinosas medianas** son **gabaérgicas** y **tienen por lo tanto** una función inhibitoria sobre sus blancos postsinápticos (225, 253). También expresan ciertos neuropéptidos como sustancia P, encefalina, dinorfina y neurotensina (9, 74, 106, 130). La expresión simultánea de algunos de estos péptidos permite definir subgrupos particulares de neuronas.

Un segundo tipo neuronal son las interneuronas, células con características morfológicas, fisiológicas y químicas diferentes de las neuronas proyectivas (146). Los estudios de coloración por la técnica de Golgi revelan una gran diversidad celular pero la mayoría comparten una característica común, la ausencia o rareza de espinas en su dendritas. Las interneuronas pueden agruparse en dos amplias categorías morfológicas:

(a) las interneuronas no espinosas gigantes, y (b) las interneuronas no espinosas medianas (63, 146).

Las **interneuronas no espinosas gigantes** son **colinérgicas** y tienen cuerpos celulares de 20-60  $\mu\text{m}$  de diámetro, con pocas dendritas que, ramificándose en forma radial, interaccionan ampliamente. El axón nace de un tronco dendrítico y también se ramifica dentro del área propia de arborización dendrítica y a veces más allá, siempre dentro del cuerpo estriado. Estas interneuronas gigantes representan menos del 3% de las neuronas estriatales y pueden ser reconocidas específicamente por la detección de la enzima CAT (242).

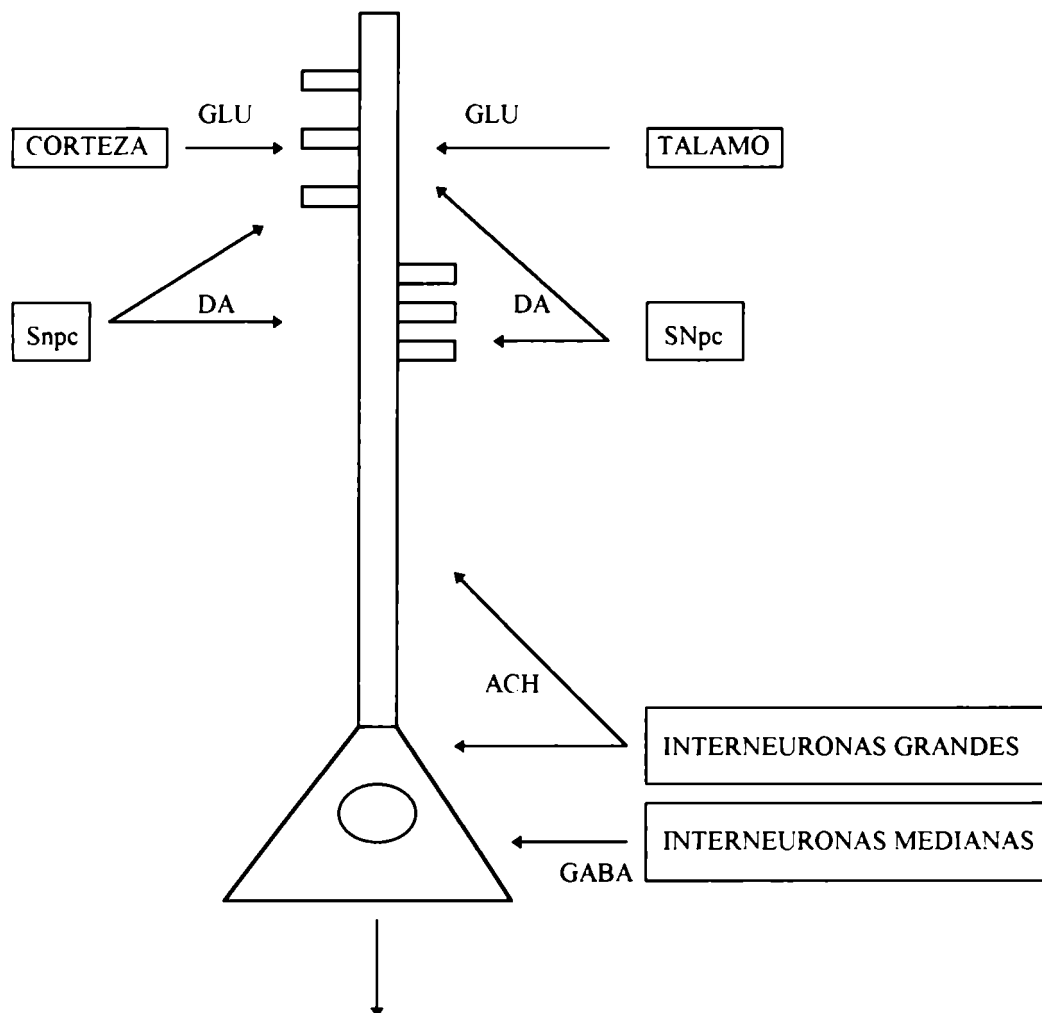
Las **interneuronas no espinosas medianas** son **gabaérgicas** y se dividen a su vez en tres categorías sobre la base de métodos inmunohistoquímicos (63, 146). El primer grupo contiene parvalbúmina y la enzima GABA descarboxilasa (GAD), representan del 3 al 5% de la población neuronal del cuerpo estriado y tienen un tamaño de 10 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro de cuerpo neuronal. Presentan de 5 a 8 dendritas y el axón es corto y profusamente arborizado. Un segundo grupo contiene somatostatina y neuropéptido Y. No contienen GAD pero si la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-D), que está involucrada en la producción de óxido nítrico, postulado como mensajero retrógrado (30, 301). La interneurona somatostatinérgica, representa del 1 al 2 % de la población neuronal, tiene un diámetro de 12 a 35  $\mu\text{m}$ , posee un axón corto y muy arborizado y 3 a 4 dendritas largas (150  $\mu\text{m}$ ), prácticamente rectas, que exhiben apéndices tipo espinas. Finalmente, el tercer grupo de interneuronas gabaérgicas presenta inmunoreactividad para calretinina y GAD, y tiene entre 7 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro.

### 1.4.3. Conexiones neuronales del cuerpo estriado

Los diferentes tipos neuronales descritos anteriormente participan en circuitos básicos donde el elemento central es la neurona espinosa mediana. Estas neuronas gabaérgicas



son el origen de las principales eferencias del cuerpo estriado, que se conectan con el globo pálido y la sustancia nigra (90, 91, 233), dando también conexiones intrínsecas.



**FIGURA 2.** Representación esquemática de la distribución de las conexiones extrínsecas e intrínsecas sobre la neurona estriatal gabaérgica proyectiva. El diagrama muestra que las aferencias extrínsecas, corticales, talámicas y de la sustancia nigra pars compacta (SNpc), tienden a ubicarse sobre la zona distal del árbol dendrítico, mientras que las aferencias intrínsecas lo hacen preferentemente sobre la zona proximal. Las fibras dopaminérgicas presentan una ubicación crucial para modular el efecto glutamatergico cortical. Aunque no se grafica en este esquema, los receptores dopaminérgicos se encuentran ubicados en la base de aquellas espinas que reciben glutamato en sus extremos. (GLU: glutamato, DA: dopamina, ACH: acetilcolina, GABA: ácido gama amino butírico).

De los dos subtipos descritos para las neuronas gabaérgicas proyectivas, el subtipo que coexpresa GABA y encefalina expone receptores dopaminérgicos D2 y conecta al cuerpo estriado con el segmento externo del globo pálido, mientras que el subtipo que coexpresa GABA, sustancia P y dinorfina, expone receptores dopaminérgicos D1 y proyecta a la sustancia nigra.

Estudios anatómicos también demuestran que estas neuronas son el blanco sináptico de la mayoría de las aferencias estriatales, incluyendo las conexiones glutamatérgicas de la corteza cerebral y del tálamo, de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y de las fibras serotoninérgicas del núcleo dorsal del Rafe; recibiendo también conexiones intrínsecas provenientes principalmente de las interneuronas.

La distribución de las sinapsis sobre la neurona gabaérgica proyectiva presenta un esquema determinado (figura 2), pudiendo ubicarse sobre el brazo dendrítico o sobre las espinas dendríticas y a su vez conectarse en la zona distal, media o proximal respecto del cuerpo neuronal, o directamente sobre el cuerpo neuronal o la fibra axónica (233).

Las aferencias extrínsecas interaccionan con la zona media y distal del árbol dendrítico, tanto sobre el brazo dendrítico como sobre las espinas; las fibras corticoestriatales realizan sinapsis asimétricas principalmente en la cabeza de las espinas dendríticas distales y las conexiones tálamoestriatales realizan sinapsis asimétricas, principalmente en el extremo distal del brazo dendrítico. Las fibras nigroestriatales realizan sinapsis simétricas en la zona media del brazo dendrítico y en el cuello de las espinas dendríticas, en particular, sobre aquellas espinas que reciben conexiones corticales y talámicas. Esta configuración indica una modulación de las fibras dopaminérgicas nigroestriatales sobre las fibras corticales y talámicas que conectan a las neuronas proyectivas medianas (29).

Las interneuronas estriatales reciben pocas aferencias extrínsecas pero, con su extensa arborización colateral, representan otra fuente principal de aferencias para las neuronas proyectivas medianas del cuerpo estriado. Las interneuronas colinérgicas realizan sinapsis simétricas virtualmente con todas las regiones de la neurona mediana proyectiva; con los brazos dendríticos, las espinas dendríticas y el pericarion neuronal en una relación 5:3:2 respectivamente (130). La distribución de las aferencias colinérgicas es marcadamente diferente al de las aferencias corticales y talámicas, y también de las aferencias de las interneuronas gabaérgicas que se observan principalmente en el pericarion y los brazos dendríticos proximales. Sin embargo, es similar al de las conexiones dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra.

#### **1.4.4. El sistema colinérgico-dopaminérgico**

Como se describió anteriormente, la interacción de los sistemas colinérgicos y dopaminérgicos es de gran importancia en la funcionalidad, plasticidad y farmacología del cuerpo estriado. El balance entre los niveles de acetilcolina y dopamina resulta fundamental para la función normal del cuerpo estriado (173). El aumento de los niveles de acetilcolina por la depleción de dopamina está asociado con aquinesias, como la enfermedad de Parkinson, mientras que el aumento de los niveles de dopamina esta asociado a distintas hiperquinesias, como la corea de Huntington. Esto puede explicarse por las interacciones entre la dopamina y la acetilcolina a nivel del cuerpo estriado. La dopamina inhibe tónicamente la liberación de acetilcolina y esta inhibición afecta un blanco postsináptico común, la neurona proyectiva mediana. Sobre estas neuronas, la depleción de dopamina también produce cambios plásticos drásticos, como el aumento de la expresión de encefalinas y la disminución de la expresión de sustancia P (106, 172). El concepto de la interacción entre la dopamina y la acetilcolina es interesante para explicar la funcionalidad del cuerpo estriado ya que la dopamina atenúa el efecto de la estimulación cortical (84), mientras que la acetilcolina parece facilitar el disparo de las neuronas proyectivas medianas. Aunque otro sitio de interacción puede ser la proyección dopaminérgica directa sobre las interneuronas

colinérgicas (173), queda claro que la interacción colinérgico-dopaminérgica modula directamente a las neuronas proyectivas medianas.

De todos modos, el desbalance entre los sistemas dopaminérgicos y colinérgicos es un modelo demasiado simplificado para explicar las patologías asociadas a la disfunción del cuerpo estriado. Además de la acción directa de la dopamina y la acetilcolina, otros neurotransmisores como el GABA y el NMDA, y los distintos neuropéptidos presentes a nivel sináptico desempeñan un papel relevante (62, 106, 233).

#### 1.4.5. Aspectos neuroquímicos

La modulación de los neuroreceptores son el primer paso en la respuesta neuronal, seguidos por los mecanismo de transducción de señal y el disparo de la expresión de los genes de transcripción inmediatos como el c-fos. Es esta sucesión de pasos neuroquímicos y su diversa gama de correlaciones posibles las que controlan y dirigen la respuesta neuronal a los estímulos externos y, por ende, representan el inicio de los procesos plásticos.

La función de los neuroreceptores es crítica y también muy compleja como se puede ver de la interrelación en que participan los principales receptores estriatales distribuidos en distintas subpoblaciones neuronales (figura 3).

El **receptor de acetilcolina tipo muscarínico** (mAChR), el **receptor de dopamina** subtipos **D1** y **D2** y el **receptor de glutamato** subtipo **NMDA** (62). La estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 en neuronas en reposo recompone los niveles de magnesio por inactivación de corrientes lentas de potasio, eliminando así el bloqueo de los receptores de NMDA, y posiciona a la neurona en un estado más eficiente para responder a la excitación glutamatérgica. Por el contrario, la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 en neuronas activadas puede inhibir una corriente lenta de sodio y estabiliza a las neuronas. Por otra parte, la acetilcolina que actúa sobre los receptores colinérgicos muscarínicos influye sobre las corrientes A de potasio que están

activadas o inactivadas dependiendo del estado celular, en reposo o en actividad, respectivamente (153). La actividad del receptor colinérgico muscarínico previene la oscilación aleatoria de la neurona entre los dos diferentes estados funcionales, y la estabiliza en el estado, inhibido o excitado, en el que se encuentra por la estimulación neurotransmisora rápida.

La transmisión a través de los receptores glutamatérgicos NMDA también es moduladora. Si bien la transmisión a través de este receptor está tónicamente inactivada en las neuronas proyectivas medianas, las interneuronas colinérgicas se encuentran activas y despolarizadas en condiciones basales y pueden ser moduladas directamente por las fibras glutamatérgicas aferentes.

Finalmente, la función del receptor dopaminérgico D2, el cual presenta una ubicación preferencialmente presináptica, sería la de inhibir la liberación de dopamina sobre el cuerpo estriado, actuando como autoreceptor. También modula, como heteroreceptor, la liberación de acetilcolina y glutamato.

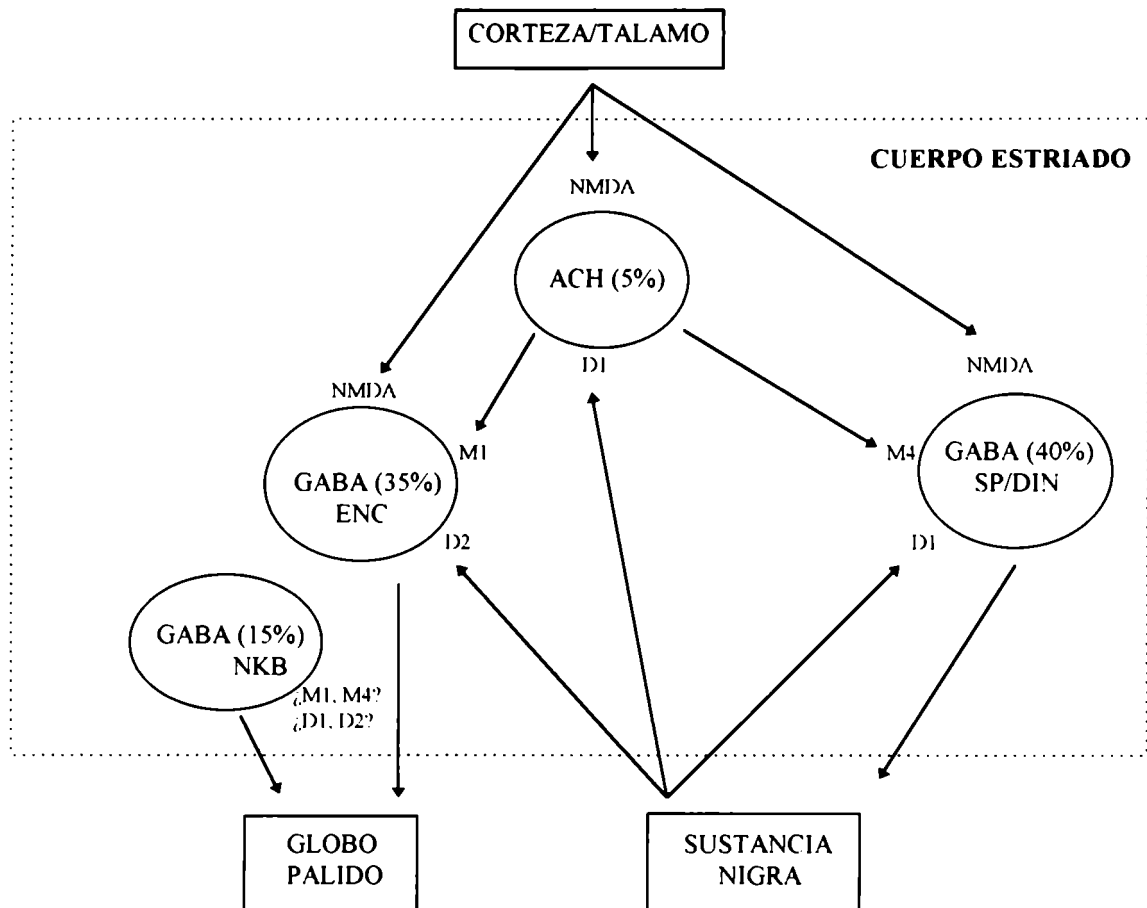
Estudios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* demuestran que la dopamina controla la transmisión mediada por acetilcolina. La facilita a través de los receptores D1 y la inhibe mediante los receptores D2. La influencia antagónica de los receptores D1 y D2 parece estar altamente equilibrada, ya que el bloqueo de ambos receptores al mismo tiempo no modifica los niveles de acetilcolina, mientras que la reducción en el tono de alguno de los dos, permite la prevalencia del efecto del otro. Aunque en condiciones basales el control de la liberación de acetilcolina parece simétrica, la estimulación de la transmisión endógena de dopamina resulta en una estimulación neta de la transmisión colinérgica debido a la activación de receptores D1 (61). Esto se debe a que la afinidad por la dopamina de los receptores D2 es 1 a 2 órdenes de magnitud mayor que la de los D1, y por lo tanto es posible que los receptores D2 se encuentren ya prácticamente saturados en condiciones basales. Un aumento de la concentración extracelular de

dopamina dará como resultado un incremento preferencial de la actividad de los receptores D1 y una rápida saturación de los receptores D2. El resultado neto será la preponderancia del papel de los receptores D1, es decir la liberación de acetilcolina.

La neurotransmisión colinérgica también ejerce influencias complejas actuando a través de distintos subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos segregados en diferentes subpoblaciones neuronales y en relación, como se verá más adelante, a los distintos mecanismos de segundos mensajeros que activa cada subtipo del receptor. Más allá de las complejas interacciones que se forman, distintos estudios farmacológicos, electrofisiológicos y neuroquímicos demuestran que la acetilcolina liberada por las interneuronas colinérgicas produce, a través de sus receptores localizados principalmente en las neuronas proyectivas, una importante modulación de la actividad funcional de las eferencias estriatales (62). La modulación iniciada por la activación de los neuroreceptores genera una cascada de cambios neuroquímicos donde intervienen procesos de fosforilación, defosforilación y generación de segundos mensajeros que finalmente producen cambios en los patrones de transcripción neuronal. Entre las proteínas más importantes que participan en estos cambios transcripcionales se encuentra la proteína del **proto-oncogén c-fos**.

El c-fos es un factor de transcripción que actúa modificando la transcripción de varios genes blancos en el SNC (251). Su transcripción se inicia inmediatamente frente a una amplia variedad de estímulos como la activación colinérgica (109), el frío (1), los factores tróficos como el NGF, FGF y PDGF (43, 52, 159) y las convulsiones (209), entre otros.

Regulado por la actividad neuronal y las conexiones sinápticas (210), el c-fos desempeña un papel importante en la plasticidad nerviosa, participa en los cambios fenotípicos y modifica las propiedades neuronales.



**FIGURA 3. Diagrama esquemático de la relación entre los diversos tipos neuronales estriatales y entre los distintos sistemas de neurotransmisión.**

Las interneuronas colinérgicas (ACH: acetilcolina) representan el 5% de la población neuronal y regulan a las neuronas proyectivas a través de dos subtipos particulares del mAChR, el M1 y el M4. Esta interacción diferencial establece dos subpoblaciones de neuronas gabaérgicas, las que expresan GABA y encefalina y proyectan al globo pálido (35%) y las que proyectan a la sustancia nigra y expresan GABA, sustancia P y dinorfina. Estas dos subpoblaciones se diferencian también por el subtipo de receptor dopaminérgico que expresan en las dendritas que reciben las fibras dopaminérgicas de la sustancia nigra. Otra subpoblación de neuronas gabaérgicas que proyectan al globo pálido expresan neuroquinina B. Aunque se desconocen muchas de sus interacciones existen evidencias que indicarían una coexpresión de receptor D1 D2. Además, las fibras glutamatérgicas corticales y talámicas actúan sobre todas las células mencionadas a través de receptores NMDA presentes en las neuronas estriatales. Por último cabe mencionar, aunque no figura en el esquema, que las diversas sinápsis presentan receptores a nivel presináptico. En particular, el receptor dopaminérgico D2 se encuentra tanto en las sinápsis dopaminérgicas como en las glutamatérgicas y colinérgicas, mientras que estas últimas también expresan al mAChR subtipo M2.

En cuerpo estriado la activación del c-fos también es importante. En neuronas que contienen sustancia P y proyectan a la sustancia nigra, los receptores dopaminérgicos D1 activan la expresión de c-fos, mientras que el receptor colinérgico muscarínico inhibe esta estimulación a través de la activación del subtipo M4. Por el contrario, en las neuronas que contienen encefalina y proyectan al globo pálido, el receptor muscarínico activa la expresión de c-fos a través del subtipo M1, mientras que los receptores dopaminérgicos D2 inhiben dicha estimulación (208). Consistentemente con esta evaluación, los antagonistas farmacológicos del receptor D2 estimulan la expresión de c-fos y los antagonistas colinérgicos inhiben la respuesta (182).

Dada la relación entre la activación de los neuroreceptores en cuerpo estriado y el c-fos, estas moléculas parecen participar en forma combinada en los principales procesos plásticos del cuerpo estriado.

#### **1.4.6. Desarrollo del cuerpo estriado**

Como otras estructuras cerebrales, el cuerpo estriado presenta distintas etapas de desarrollo hasta la conformación de la entidad funcional del adulto. Estas etapas, iniciadas durante el desarrollo embrionario y fetal, continúan durante cierto tiempo después del nacimiento, en especial los procesos relacionados con la funcionalidad de la estructura.

Las distintas etapas del desarrollo y los tiempos en los que suceden son similares en la rata y en el ratón, animales de los que se dispone suficiente información como para establecer los períodos críticos del desarrollo anatómico y funcional de este sistema. Por otra parte, estudios realizados en primates superiores, evidencian una correlación estrecha entre los períodos críticos del desarrollo en rata y en primates. Esto permite hacer una aproximación relativa de lo que sucede en el hombre.

En el ratón, la emergencia del cuerpo estriado se produce durante la segunda mitad de la gestación. El pico de producción de células se encuentra entre los días 14 y 18 de la gestación (G14 - G18) (261). Sin embargo, la división de las interneuronas en el



estriado tiene su pico hacia el día G21 en rata y se extiende hasta varios días después del nacimiento (56). Este período coincide, principalmente, con el período de producción celular en la corteza cerebral, que se extiende aproximadamente desde el G12 hasta el G18. Por otra parte, el período de producción de células de la otra estructura aferente principal del cuerpo estriado, la sustancia nigra, sucede con anterioridad, entre los días G10 y G14 (261).

Sin embargo, las conexiones de estas estructuras son un poco posteriores. La sustancia nigra comienza a enviar sus axones hacia el cuerpo estriado al comienzo de la 3<sup>o</sup> semana de gestación en el ratón, pero los mismos no llegan al cuerpo estriado hasta el día G20 ó G21, es decir hasta casi el momento del nacimiento (170, 171). Además estas conexiones no son funcionales hasta avanzado el desarrollo postnatal.

Un elemento que guarda especial importancia en el desarrollo del sistema motor extrapiramidal, es como van madurando los sitios de unión a los neurotransmisores involucrados en el circuito, el desarrollo de la selectividad farmacológica y la habilidad de distinguir estereoisómeros. La ontogenia del receptor dopaminérgico comienza entre el G15 y el G18 (204), mientras que el desarrollo del receptor colinérgico muscarínico parece ser un poco anterior, alrededor del G13 (12, 48).

No obstante estar presentes desde el desarrollo embrionario, la primera evidencia de acoplamiento funcional entre los terminales dopaminérgicos provenientes de la sustancia nigra y las interneuronas colinérgicas del estriado se encuentra hacia comienzos de la segunda semana de vida, alrededor del día 8 postnatal, PN8 (49). En el primer día de vida, la actividad de la enzima tirosina-hidroxilasa, presente en los terminales dopaminérgicos en el cuerpo estriado es un 10% de la actividad que se registra en el adulto. Luego va aumentando linealmente hasta llegar a ser un 75% de la actividad madura hacia finales de la 4<sup>o</sup> semana de vida. Algo similar ocurre con la actividad de la CAT, enzima presente en los terminales colinérgicos. Hacia el nacimiento su actividad en el cuerpo estriado es el 2% de la observada en el adulto y va

aumentando muy lentamente durante la 1<sup>o</sup> semana de vida; posteriormente, su actividad crece rápidamente hasta llegar al 70% de la actividad del adulto hacia el día PN28 (49).

Del mismo modo, la estabilización de los niveles adultos de neuroreceptores en cuerpo estriado se produce postnatalmente. La cantidad de receptores dopaminérgicos en el cuerpo estriado va aumentando desde el nacimiento para alcanzar los valores del adulto al final del primer mes de vida (231), mientras que los niveles maduros de receptor colinérgico muscarínico se alcanzan alrededor de los días PN18 - PN20 (12, 48). El aumento de los niveles de receptor colinérgico se correlacionan con el aumento progresivo del número de terminales nerviosos que en cuerpo estriado presenta un período importante de sinaptogénesis alrededor del día PN13 al PN17 y probablemente represente la formación de las sinapsis colinérgicas (123). En este sentido, otros estudios han demostrado que las neuronas colinérgicas, si bien son probablemente las primeras neuronas que aparecen en el cuerpo estriado, presentan un dramático aumento y complejización de su arborización dendrítica alrededor del día PN14 (243).

Finalmente, la maduración funcional de los sistemas de neurotransmisión no sólo debe ser evaluada en término de la adquisición de los niveles adultos de neuroreceptores, sino también en base a la aparición de interacción con otras moléculas moduladoras de la neurotransmisión. Desde esta perspectiva, la interacción del sistema colinérgico y dopaminérgico con distintos neuropéptidos, encefalina y taquinina, alrededor del día PN15 al PN21, contribuye a la maduración sináptica afectando su funcionalidad y plasticidad (240, 275).

## **1.5. EL RECEPTOR COLINERGICO MUSCARINICO**

### **1.5.1. El sistema colinérgico y la plasticidad del Sistema Nervioso**

Las neuronas del SNC que utilizan acetilcolina como neurotransmisor en sus sinapsis no conforman un sistema neuronal simple o una red neuronal continua como la mayoría

de los otros sistemas de neurotransmisión clásicos. A pesar de la presencia de **proyecciones colinérgicas** en las motoneuronas de los nervios craneales, las neuronas parasimpáticas de la médula espinal, las fibras colinérgicas del núcleo basal magnocelular, del área tegmental pedunculopontino y del núcleo de la banda diagonal de Brocca, la participación del sistema colinérgico en circuitos locales a través de interneuronas conforma una parte sustancial de la actividad colinérgica del cerebro. Las **interneuronas colinérgicas** se encuentran principalmente en el cuerpo estriado, núcleo accumbens y corteza cerebral y también en el hipocampo, la amígdala y el tubérculo olfatorio (20, 317). Se considera que estos circuitos internos desempeñan un papel importante como moduladores de la actividad final de las estructuras en que participan. La función de las interneuronas colinérgicas en el cuerpo estriado fue discutida en el capítulo anterior. En corteza cerebral las interneuronas colinérgicas muestran una distribución homogénea y representan un tercio de los terminales sinápticos totales (69). Sumado al hecho de que alrededor del 30% de las neuronas corticales son colinoceptivas (167), queda confirmada la importancia moduladora de los circuitos colinérgicos en la actividad cortical.

La importancia de la neurotransmisión colinérgica central también puede evaluarse a través de una serie de funciones cerebrales que se ven afectadas por la alteración de este sistema. El deterioro de la función colinérgica es un hallazgo temprano y constante asociado a distintos desórdenes nerviosos de la más diversa índole. Se encuentra presente en la amnesia, la demencia (incluyendo la demencia postalcohólica y la enfermedad de Alzheimer), las alteraciones motoras como la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington, y otras neuropatologías (16, 20, 236). El sistema colinérgico también ha sido especialmente involucrado en los procesos de aprendizaje, memoria y en procesos atencionales (3, 23). Si bien la mayoría de estos mecanismos involucran preponderantemente las proyecciones colinérgicas, la importancia de los circuitos colinérgicos internos no deben ser menospreciados, en especial el del cuerpo estriado involucrado en las patologías neuromotoras.

La participación del sistema colinérgico en los mecanismos plásticos fue confirmada por los estudios de plasticidad en el sistema visual y por el análisis de los cambios plásticos en las estructuras en barril de la corteza somatosensorial de ratón.

Por otra parte, estudios ontogénicos de los receptores colinérgicos muscarínicos en la corteza visual muestran alteración en el número, afinidad y distribución laminar durante el período crítico de plasticidad neuronal (282, 299), mientras que otras investigaciones demuestran una función importante de distintos subtipos del receptor muscarínico en la maduración postnatal de la función visual (259). Además, la interferencia sobre el sistema colinérgico, por depleción de acetilcolina o administración de antagonistas muscarínicos, modifica los efectos plásticos de la privación monocular en corteza visual de gatos (17, 111). Estos datos involucran al sistema colinérgico en los procesos de regulación del desarrollo y en el establecimiento de circuitos corticales.

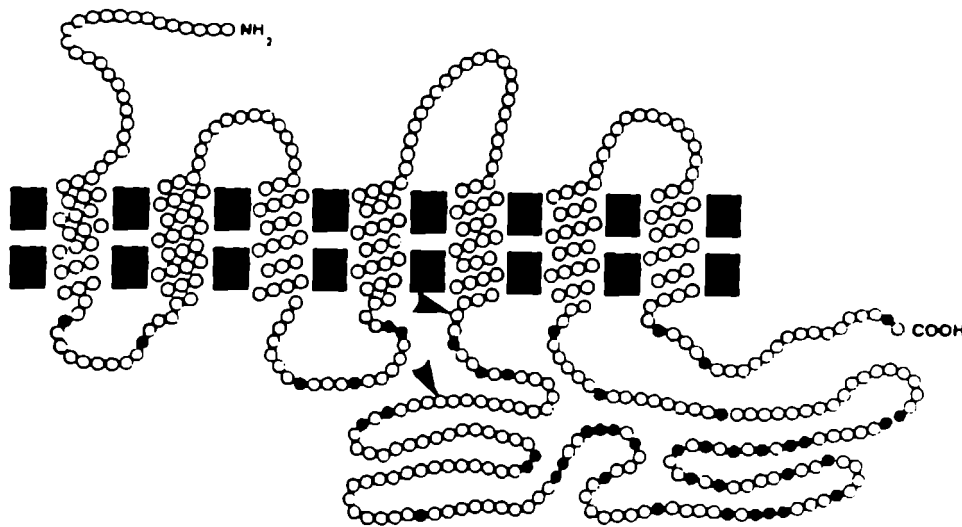
En la corteza somatosensorial de ratón, el número de receptores colinérgicos está disminuido por la denervación neonatal de las bigotes y representa un marcador de plasticidad en dicho modelo (93).

Toda esta información en conjunto demuestra la participación del sistema colinérgico en la plasticidad nerviosa y permiten enfocar la atención en el neuroreceptor de acetilcolina como marcador principal en los procesos plásticos.

### **1.5.2. El receptor colinérgico muscarínico**

La transducción de señales mediadas por acetilcolina se realiza a través de dos clases diferentes de receptores, denominados receptor colinérgico muscarínico y nicotínico. La distinción entre ambos receptores se realizó originalmente por la activación independiente del sistema colinérgico por muscarina y nicotina, respectivamente. También por el descubrimiento de antagonistas diferenciales para ambas activaciones, atropina para el receptor muscarínico y curare para el receptor nicotínico (53, 54). Una característica saliente en la comparación de ambos tipos de receptores es que no

pertencen al mismo linaje molecular y su comportamiento funcional es absolutamente diferenciable (219). El receptor colinérgico nicotínico es una estructura pentamérica que forma canales catiónicos. Por el contrario, el mAChR es una proteína monomérica que pertenece a la superfamilia de receptores que unen proteínas G y que presentan 7 regiones predecibles de transmembrana (figura 4) (223).

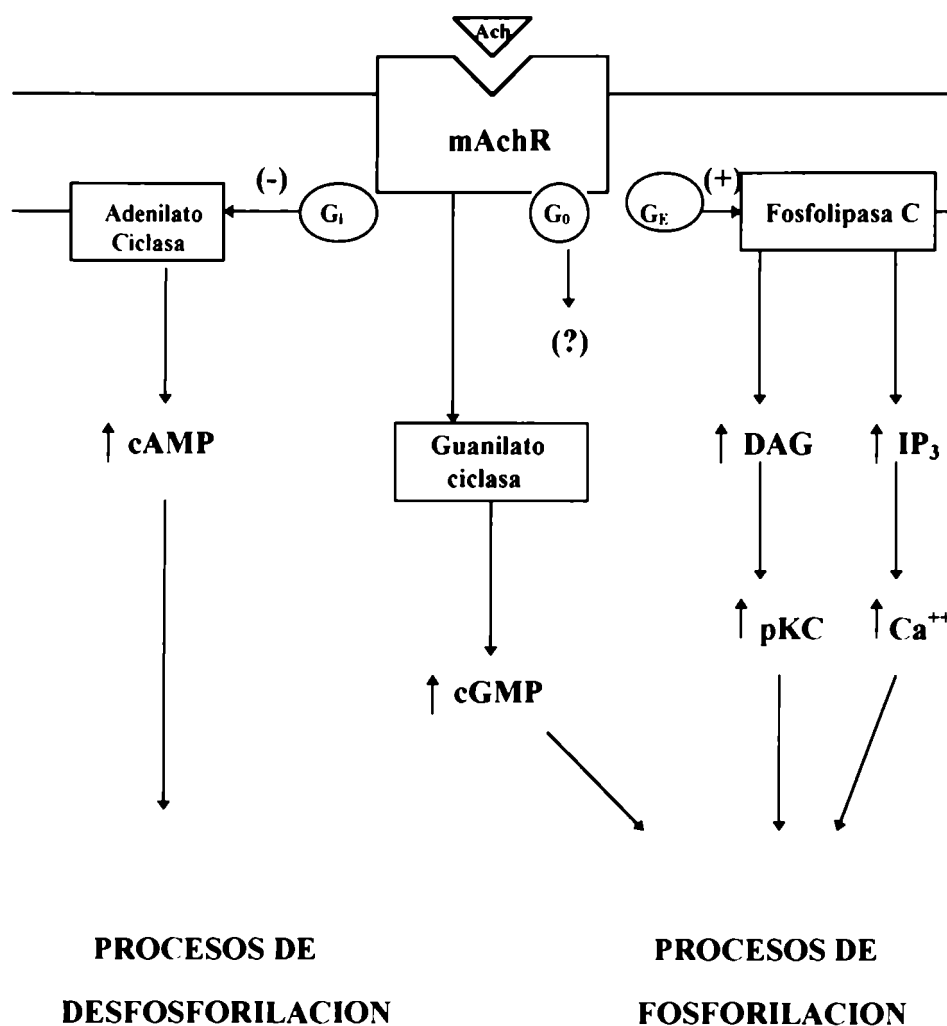


**FIGURA 4. Probable estructura del mAChR.** Esta representación general está basada sobre la estructura del mAChR M2 (237). Los distintos subtipos del receptor muestran una alta homología en las regiones de transmembrana pero exhiben una diferencia considerable de la secuencia correspondiente a la 3ª región intracitoplasmática, zona involucrada en la interacción con los sistemas intracelulares de transducción de señal. La secuencia delimitada por las flechas, por ejemplo, determinan la selectividad de la interacción del subtipo M2 a proteína G. Cada círculo representan un aminoácido de la secuencia y los círculos llenos localizan, para el caso del M2, las serinas y treoninas que pueden ser fosforiladas. Las imicas serinas orientadas hacia el citoplasma en el mAChR se encuentran en la 3ª región intracitoplasmática.

El mAChR constituye la mayoría de las sinapsis colinérgicas del SNC y presenta una importante diversidad de subtipos (237). Los primeros estudios farmacológicos con pirenzepina sugirieron la presencia de al menos dos subtipos muscarínicos denominados M1 y M2 (121). La unión de pirenzepina en cerebro era de alta afinidad, mientras que

en músculo cardíaco presentaba una afinidad 100 veces menor. Este descubrimiento dió lugar a mayores investigaciones y a la conclusión consensuada de que los receptores muscarínicos de cerebro, denominados M1, eran distintos a los cardíacos, denominados M2.

La investigación bioquímica de esta diversidad farmacológica fue profundizada con la aparición de antagonistas de mayor afinidad como el quinuclidinil benzilato (QNB) y la metilscopolamina (NMS), así como por el desarrollo de un sistema de cromatografía de afinidad altamente específico (116). Con estas herramientas, el mAChR fue identificado como una proteína de 70 a 80 kilodaltons, sin observarse diferencias de tamaño molecular entre los receptores de distintos tejidos. Luego de la purificación del mAChR de cerebro y corazón de cerdo (117, 241), se publicaron las secuencias del receptor M1 y M2 obtenidas por clonado, secuenciación y expresión molecular (162, 163, 238). La comparación de las secuencias obtenidas demostraron que el receptor de cerebro M1 y de corazón M2, a pesar de estar relacionados, presentan sólo un 38% de secuencia idéntica. La profundización mediante estudios farmacológicos, bioquímicos, inmunológicos y moleculares permitió demostrar, finalmente, la existencia de al menos 5 subtipos del mAChR. Todos ellos están expresados en el SNC (27, 28, 181, 237, 304). La nomenclatura actual denomina a los 5 subtipos de receptores como m1, m2, m3, m4 y m5, mientras que la secuencia que codifica a cada uno se denomina M1, M2, M3, M4 y M5, respectivamente (21). Los 5 subtipos presentan la misma topografía putativa de membrana y son homólogos, principalmente en sus dominios de transmembrana. La mayor diferencia entre los distintos subtipos se encuentra en el tercer loop citoplasmático que conecta el 5° y 6° segmento de transmembrana (28, 29, 238). En esta divergencia reside la diferencia de cada subtipo al acoplamiento con los distintos sistemas intracelulares de transducción de señales. De hecho, los subtipos m1, m3 y m5 que acoplan las mismas vías de transducción, como se verá a continuación, presentan una similitud mayor entre sí que con el m2 y el m4, y viceversa.



**Figura 5. Esquema de las vías de transducción de señal acopladas al mAChR.** El diagrama ilustra las principales vías de transducción de señal acopladas al receptor. En los subtipos M2 y M4 del mAChR, la activación por acetilcolina (ACh) produce la atenuación de la adenilato ciclasa a través de una proteína G inhibitoria (G<sub>i</sub>). La disminución de los niveles de cAMP permite la preponderancia de los mecanismos de defosforilación. Por el contrario, la activación de los subtipos M1, M3 y M5 produce, a través de una proteína G (G<sub>q</sub>) insensible a la toxina de pertusis, un aumento de la actividad de pKC mediante la estimulación de fosfolipasa C y los mecanismos que esta enzima pone en funcionamiento (aumento de diacilglicerol -DAG- y calcio intracelular).

### 1.5.3. Mecanismos de señalización intracelular

Los distintos subtipos del mAChR se acoplan a múltiples proteínas G para modular una amplia cascada de eventos intracelulares que incluye la estimulación de fosfolipasas C, A<sub>2</sub> y D, la atenuación de la síntesis y la estimulación de la degradación del AMPc, la estimulación de la producción de GMPc y la regulación de varios canales iónicos (figura 5) (131). Estudios en varios tipos celulares que fueron transfectados, con vectores que contenían el ADN copia de cada uno de los 5 subtipos, demostraron fehacientemente que los subtipos m1, m3 y m5 pueden producir una fuerte estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos, mientras que los subtipos m2 y m4 atenúan la actividad de la adenilato ciclasa y sólo en algunos tipos celulares estimulan, débilmente, la hidrólisis de fosfoinosítidos (11, 239, 281). Además, la diversidad de señalización se realiza por diversos caminos. Un mismo subtipo de receptor puede activar más de un tipo de proteína G (11), y también desencadenar conjuntamente dos vías efectoras distintas como la atenuación de la adenilato ciclasa y la estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos (10).

A partir de los mecanismos de respuesta intracelular, la importancia del receptor colinérgico muscarínico en los diversos mecanismos plásticos se ve remarcada por su relación con los procesos de fosforilación. En especial, diversos estudios han sugerido la participación de la protein quinasa C (pKC) en los mecanismos intracelulares que involucran la respuesta colinérgica. Precisamente, la pKC es una enzima asociada a varios procesos de plasticidad neuronal, transitorios y permanentes. Involucrada en la generación de regulación celular a largo plazo, a partir de señales transientes y segundos mensajeros (215), la pKC es activada por la transmisión colinérgica. La estimulación de la fosfolipasa C, principalmente por los subtipos m1, m3 y m5, cataliza la hidrólisis de fosfolípidos produciendo inositol trifosfato (inductor de la liberación de Ca<sup>++</sup>) y diacilglicerol (activador fisiológico de pKC) (70, 184).

Por el otro lado, distintos datos experimentales involucran a la pKC en la regulación del mAChR. Aunque no existe demostración *in vivo* definitiva de la fosforilación directa del



mAChR por pKC durante procesos fisiológicos, las evidencias son importantes (70, 215). Respaldo este concepto, el mAChR purificado de cerebro y de corazón de cerdo es un excelente sustrato de fosforilación para la pKC *in vitro* (118, 254). Las consecuencias funcionales de la fosforilación del mAChR por pKC han sido estudiadas *in vitro* y parecen involucrar la modulación de la interacción del receptor con la proteína G (254). Sin embargo, no está confirmado que esta reacción ocurra en células intactas ya que otros estudios no han podido comprobar la fosforilación del mAChR en corazón de pollo luego de la activación de la pKC (166). Una explicación parece ser que el receptor cardíaco de mamífero (m2) no sería sustrato de la pKC (276). De hecho, la fosforilación por pKC resulta específica de algunos subtipos, siendo los subtipos m1, m3 y m5 los sustratos principales (115, 119). Como consecuencia de este proceso de fosforilación, se ha descrito la inhibición de la respuesta colinérgica y la desensitización del receptor, involucrando mecanismos de internalización y probable degradación (70, 184).

En realidad, los procesos de fosforilación sobre el mAChR no se limitan a la actividad de la pKC; otras quinasas parecen participar de igual modo. Precisamente, la primera sugerencia de la participación de procesos de fosforilación sobre el mAChR involucraba cambios en los niveles de AMPc, un activador de protein quinasa A (pKA) (34). En este sentido, también ha sido demostrado que los receptores muscarínicos de cerebro y corazón porcino pueden ser fosforilado por pKA (128, 263). Además, otros estudios sugieren que la pKA puede modular la capacidad del receptor m2, pero no del m1, de ser sustrato de pKC (276).

Finalmente, otros experimentos indican que la disminución de la unión de un ligando específico del mAChR a membranas sinápticas de corteza cerebral de rata es dependiente de calmodulina (35). La calmodulina activa la CAM quinasa II sugiriendo una posible función directa de esta enzima en la fosforilación del receptor. Fisiológicamente, el aumento de calmodulina puede producirse por un incremento en los niveles de AMPc por pKA o por la fosforilación de sustratos específicos de pKC.

Estos experimentos sugieren, entonces, una posible acción indirecta de estas dos quinasas.

La evaluación de los distintos procesos de fosforilación y señales intracelulares relacionadas con el sistema colinérgico indica indudablemente el papel complejo que desempeñan estos receptores en la respuesta neuronal. Seguramente, la activación y funcionamiento de cada mecanismo intracelular descrito depende no sólo del subtipo de receptor involucrado sino también de la distribución en el SNC y del tipo neuronal en que está presente. Precisamente, las diferencias moleculares en la tercer tercer loop citoplasmático, que parece ser la clave para comprender las distintas funciones de cada subtipo, también posibilitan estudiar la presencia de los distintos subtipos en las diferentes áreas del SNC. El desarrollo de un panel de anticuerpos específicos para cada subtipo (179, 180, 305, 306) y el empleo de sondas específicas para cada receptor permitió finalmente esta evaluación.

#### **1.5.4. Distribución en el Sistema Nervioso Central**

El estudio de la distribución de los distintos subtipos del mAChR en el SNC, de rata principalmente, fue abordado por cuatro metodologías diferentes que ofrecen distinta información. Estas metodologías son: la implementación de sondas específicas por la técnica de hibridación *in situ* (33), el empleo de primers específicos mediante la técnica de PCR reversa (307), la utilización de anticuerpos específicos y de técnicas de inmunoprecipitación (177, 292) y el uso de ligandos con distinta afinidad por cada subtipo (237, 304, 323). Las primeras dos metodologías permiten la detección de las neuronas que expresan el ARNm del receptor, mientras que las dos últimas permiten detectar la ubicación celular de la molécula.

Las conclusiones de las distintas aproximaciones metodológicas son aproximadamente coincidentes. En primer lugar se observa que, en el cerebro, los subtipos cuantitativamente más importantes son el m1, m2 y m4, mientras que el m3 y el m5 presentan concentraciones tan bajas que sólo las metodologías más sensibles fueron

capaces de detectarlos (307). Los subtipos m1, m2 y m4 se encuentran, además, altamente concentrados en cuerpo estriado, corteza motora e hipocampo, estructuras que en ese orden, presentan las mayores concentraciones de mAChR en el cerebro. Estudios inmunohistoquímicos por microscopía óptica y electrónica, los cuales permiten el análisis de la distribución subcelular de los neuroreceptores, aportaron evidencias muy fuertes que hacen suponer una función de autoreceptor para el subtipo m2 (126, 177). De esta manera, la ubicación del subtipo m2 sería principalmente presináptica mientras que el m1 y m4 presentarían una ubicación postsináptica.

#### **1.5.5. El receptor colinérgico muscarínico en el cuerpo estriado**

Los estudios cualitativos y cuantitativos de distribución anatómica del mAChR resaltan la importancia de este receptor en el cuerpo estriado, no sólo porque representa la estructura con mayor concentración de receptores colinérgicos sino porque en ella se hallan presente los 5 subtipos del receptor.

Como en la mayoría de las estructuras con actividad colinérgica del cerebro, los principales subtipos en el cuerpo estriado son el m1, m2 y m4. En particular para el receptor m4, el cuerpo estriado presenta por lejos, la mayor concentración de receptores en todo el SNC (307).

Estudios por inmunoprecipitación demuestran que el porcentaje relativo de cada subtipo en el cuerpo estriado es el siguiente: m1 (27%), m2 (12%), m4 (48%), mientras que el m3 y el m5 representan menos del 5% del total (178). Esta relación se mantiene prácticamente inalterada a distintas edades de evaluación postnatal (292). Otros estudios con la misma metodología muestran una relación más pareja entre los 3 principales subtipos: m1 (31%), m2 (29%) y m4 (29%), mientras que la proporción del m3 y m5 es menor al 1% para cada uno de ellos (177).

Un análisis realizado con sondas específicas aporta datos complementarios y en concordancia con los estudios inmunoquímicos. En el cuerpo estriado, las técnicas de hibridación y autoradiografía sólo detectan los subtipos m1, m2 y m4 (308). El primero

y el último se expresan en las neuronas medianas y por su distribución parecen encontrarse principalmente en las neuronas proyectivas gabaérgicas. Por otro lado, el receptor m2 se expresa casi exclusivamente en las interneuronas colinérgicas gigantes, lo que confirma su papel como autoreceptor. De la población neuronal total, el receptor m1 se encuentra presente en el 81% de las células, el m2 en el 3.5% y el m4 en el 42%. La baja cantidad de neuronas que expresan el subtipo m2 está en concordancia con el porcentaje total de interneuronas colinérgicas en el cuerpo estriado, alrededor del 3% (242).

Los resultados de las mencionadas investigaciones son coherentes con el análisis de distribución realizado por el método inmunohistoquímico. La detección mediante anticuerpos específicos, directamente sobre el tejido, demostró que el 78% de las neuronas expresan el subtipo m1 en sus dendritas, el 44% expresan el m4, también con ubicación preferencialmente postsinápticas, y un 2.5% de las neuronas presentan el subtipo m2, principalmente en forma presináptica (126). Estos estudios, conjuntamente con otros, permitieron demostrar que la población de neuronas proyectivas gabaérgicas del cuerpo estriado presenta dos subpoblaciones bien definidas. Una expresa los receptores m1 y D2 en sus dendritas, utiliza GABA y encefalina para la transmisión y proyecta al globo pálido. La otra expresa los receptores m4 y D1 en sus dendritas, utiliza GABA y sustancia P en la transmisión y proyecta a la sustancia nigra (62). Claramente la distribución y características de los distintos subtipos aportan información fundamental para comprender la función del receptor muscarínico en los distintos procesos neuronales en el cuerpo estriado.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. MATERIALES**

### **2.2. ENTRENAMIENTOS**

### **2.3. OBTENCION DEL TEJIDO PARA ESTUDIOS NEUROQUIMICOS**

### **2.4. DETERMINACIONES NEUROQUIMICAS**

*«Si uno comienza con certidumbre  
terminará con dudas; pero si uno se  
conforma con empezar con dudas  
terminará con certidumbres» Bacon*

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. MATERIALES**

#### **2.1.1. Drogas y reactivos**

##### **2.1.1.1. Determinación de receptores**

Los ligandos radioactivos fueron obtenidos de NEN Dupont a través de su representante en el país. Fueron adquiridos  $^3\text{H}$ -Spiperone,  $^3\text{H}$ -QNB,  $^3\text{H}$ -MK-801. El ligando  $^3\text{H}$ -SCH23390 fue donado gentilmente por el Dr. Jorge Medina del Instituto de Biología Celular de la Facultad de Medicina. El MK-801 frío fue una donación de los laboratorios Merck Sharp & Dohme de Argentina. El desplazante SCH23390 frío fue donado por el Dr. Gustavo Dziewczapolski, del ININFA, Buenos Aires, mientras que el resto de las drogas necesarias fueron compradas en Sigma Co (St. Louis, Mo, EEUU).

##### **2.1.1.2. Inmunohistoquímica**

Los anticuerpos de ratón anti-GFAP y anti-NF fueron comprados a BioGenex (San Ramon, CA, EEUU). El anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado y el complejo avidina-peroxidasa fueron adquiridos a Sigma Co (St. Louis, Mo, EEUU). El anticuerpo anti-proteína c-fos de conejo fue obtenido de Oncogene Science (Uniondale, NY, EEUU). El complejo de anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo y el sistema de revelado con diaminobenzidina fue provisto por un kit de Vector (Burlingame, CA, EEUU).

##### **2.1.1.3. Amplificación de ARN por PCR**

Para la amplificación por PCR los primers fueron sintetizados por Biosynthesis Inc (California, EEUU), los hexámeros al azar fueron comprados en Biodynamics SRL (Argentina) y se utilizó un kit de amplificación de Perkin-Elmer (San Francisco, EEUU). El marcado de PM, 1Kb ladder fue adquirido a BRL.

#### **2.1.1.4. Otras metodologías**

EL resto de las drogas, excepto que se describa otro origen en el texto, fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA), Carlo Erba (Italia) o Mallinckrodt Chemical Works (USA).

#### **2.1.2. Instrumental**

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes equipamientos: centrífuga clínica TJG, microcentrífuga ECYS, espectrofotómetro UV/visible Jasco J 0063, cubetas de cuarzo Fisherbrand, cubetas descartables Kartell, microscopio óptico Axioplan, contador de centelleo Tm Analytic 6891/Delta 300, homogeneizador de tejido Tissue-tearor modelo 985-370 Biospec Products Inc, cubas de electroforesis Vertical Slab Gel Unit modelo SE 200 Hoefer de Scientific Instruments y fuente de poder BRL500 Life Technology. Todas las centrifugaciones de alta velocidad se realizaron en una centrífuga Sorvall RC5C provista de un rotor SS-34 y las ultracentrifugaciones en una centrífuga Beckman XL-90 con un rotor TI-90. El aparato de filtración para separar el ligando libre del unido en los ensayos de unión a ligando, fue construido personalmente siguiendo el diseño de un equipo de Millipore.

#### **2.1.3. Animales**

##### **2.1.3.1. Cepas utilizadas**

El animal escogido como modelo experimental en el presente trabajo fue la rata de las cepas Sprague-Dawley y Wistar. Los animales Sprague-Dawley, originarios del Instituto Holtzman de EEUU, fueron suministrados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los animales de la cepa Wistar, originaria del Instituto Wistar de Anatomía y Biología de EEUU, fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas (UBA) y del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME).

### **2.1.3.2. Mantenimiento de los animales**

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas, temperatura 20-22 °C y ciclo de luz-oscuridad de 12 hs iniciando el período de luz a las 8.00 AM. En las jaulas, dispusieron de alimento y agua *ad libitum* y una distribución de espacio similar para los distintos grupos experimentales.

## **2.2. ENTRENAMIENTOS**

Los animales fueron entrenados según dos tests diferentes: el Test de Entrenamiento Circular y el Test del Disco Giratorio. Los animales, machos o hembras según indique el experimento correspondiente, fueron entrenados a distinta edad y con distintos esquemas de entrenamiento.

### **2.2.1. Test de Entrenamiento Circular**

#### **2.2.1.1. Diseño y características del equipo**

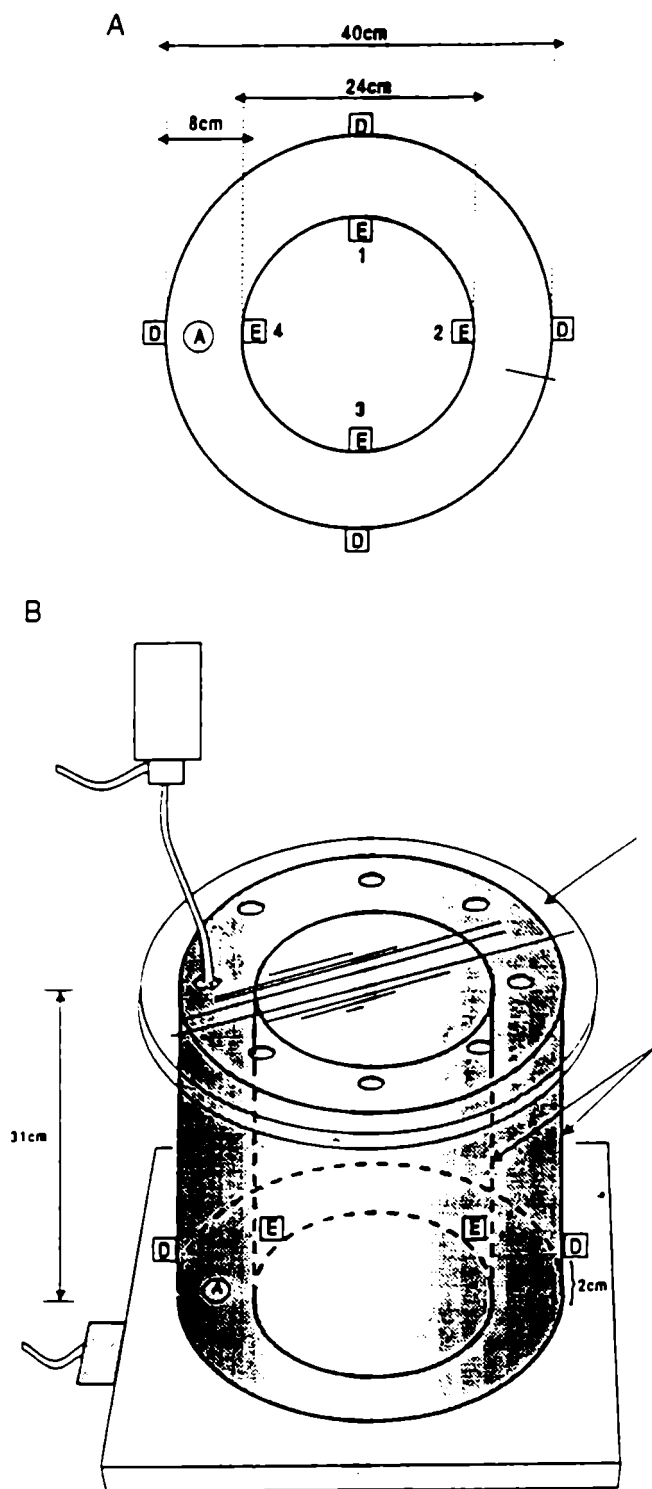
A fin de realizar el TEC en forma automática y así obtener mediciones objetivas, se desarrolló un aparato acoplado a un dispositivo electrónico que permitiera realizar el conteo de vueltas, el tiempo requerido para realizar una determinada cantidad de vueltas y la administración de la recompensa en forma automática (31, 32).

El aparato empleado está conformado por una pista circular de 16 cm de ancho construida con dos cilindros de metal de 1.8 mm de espesor y 31 cm de alto a cada lado de la pista, figura 6. Los cilindros de 24 cm y 40 cm de diámetro, fueron colocados concéntricamente sobre una base de madera y el piso de la pista fue recubierto con goma antideslizante. Todo el material fue pintado de negro. La pista de entrenamiento fue iluminada con una luz blanca externa al aparato que incidía homogéneamente sobre toda la pista. Y recubierta con una tapa de acrílico de 2 mm de espesor con 4 orificios a 90° coincidiendo, cada uno, con la posición de cada par de emisor-detector infrarrojo.



Cuatro emisores de rayos infrarrojos fueron colocados por dentro del cilindro interno, y cuatro sensores o detectores infrarrojos fueron colocados por fuera del cilindro externo en forma apareada con los emisores. Cada par fue ubicado a cada 90° de la circunferencia a 2 cm por encima del piso y numerados del 1 al 4 en sentido horario. Los cuatro sensores fueron conectados a una unidad de memoria en forma secuencial. Los sensores son activados cuando el haz infrarrojo es interrumpido, lo cual sucede cuando algo se interpone entre el emisor y el detector, en este caso el animal en estudio. Los sensores fueron conectados al circuito de memoria de manera tal que siempre se requiere que el sensor anterior haya sido activado para que la activación del siguiente sea registrada. Así, a medida que el animal va recorriendo una vuelta en el sentido considerado correcto, los sensores van siendo activados. Por ejemplo, si el animal debe realizar una vuelta en sentido horario para obtener su recompensa, debe interrumpir el rayo infrarrojo del detector 1 antes de interceptar el rayo del emisor 2, de lo contrario por más que el segundo rayo sea interceptado esto no es registrado en el circuito de memoria, y lo mismo sucede con el detector 3 y 4. Cuando el 3° sensor es activado, el animal ya recorrió las 3/4 partes del círculo en el sentido correcto y se activa el dispensador de la recompensa que libera, a la altura del 4° sensor, una gota de agua azucarada de un recipiente anexo. Al llegar el animal al 4° sensor, el mismo es activado, una vuelta es computada por el contador de vueltas y se resetea el dispositivo de memoria quedando en condiciones de iniciar un nuevo ciclo. El animal puede moverse libremente en ambos sentidos dentro del aparato, pero sólo recibirá la recompensa si realiza una vuelta completa en el sentido previamente asignado como correcto, ya que cada vez que el animal intercepte el 4° sensor el dispositivo de memoria es reseteado borrando el registro de sensores que puedan haber sido activado hasta el momento.

El aparato cuenta con un interruptor que permite seleccionar el sentido en el cual los sensores deben ir siendo activados para que finalmente la recompensa sea liberada. Esto permite elegir el sentido de giro considerado correcto.



*Figura 6. Aparato de entrenamiento circular. (A) Vista desde arriba con las dimensiones y la localización de los diodos emisores de luz infrarroja -E-, detectores infrarrojos -D- y lugar donde se recibe la recompensa -A-. (B) Vista frontal del aparato. El dispensador y 2 de los cuatro pares de emisor-detector -E,D-.*

El dispositivo dispensador de agua fue construido con una válvula electromagnética o solenoide cuyo conducto de entrada está conectado a un frasco que contiene la recompensa colocado a una altura suficiente que permita la circulación de la solución por presión hidrostática. Al orificio de salida de la válvula se le conectó un tubo de goma hasta la parte superior del aparato de entrenamiento colocado por encima del 4° sensor, conectado a una aguja hipodérmica ubicada sobre el orificio correspondiente al 4° sensor en la tapa de acrílico del aparato y en forma tal que el animal no tiene acceso a la aguja. Al ser activado el 3° sensor se envía un pulso eléctrico a la válvula, la cual permanece abierta el tiempo que dure el pulso. Mientras la válvula está abierta la solución de la recompensa circula y cae al piso de la pista en el lugar indicado, donde es ingerida por el animal. La duración del pulso eléctrico puede ser regulada por medio de un potenciómetro, así se ajusta el tiempo que permanece abierta la válvula y por lo tanto el volumen de recompensa que es liberado. En las condiciones establecidas en este trabajo, la gota liberada tenía un volumen aproximado de 50  $\mu$ l.

#### **2.2.1.2. Entrenamiento en el TEC**

A cada animal, se le asignó aleatoriamente un sentido de giro, izquierdo o derecho, el que fue considerado como sentido correcto. Esto significa que el animal sería recompensado si realizaba una vuelta completa en dicho sentido. Una solución de agua con azúcar al 10% p/v fue utilizada como recompensa. El test consistió de una serie de sesiones consecutivas, recibiendo cada animal una única sesión diaria. Durante el tiempo que duró la prueba los animales sólo recibieron agua durante la sesión, permaneciendo deprivados de agua, pero no de comida, el resto del tiempo en que se encontraban en la jaula. Los animales fueron deprivados de agua 24 hs antes de la primera sesión, considerada sesión 0 (S0).

La primera sesión de entrenamiento (S0), de 30 min de duración, fue utilizada para que el animal se habituara al aparato de entrenamiento y se le indicara el sentido de giro en el cual sería recompensado. La técnica utilizada fue el moldeamiento de la conducta,

para lo cual el animal fue recompensado manualmente cada cuarto de vuelta que realizó en el sentido correcto durante los primeros 10 min de la sesión. Durante los 10 min siguientes, el animal fue recompensado cada media vuelta dada en el sentido correcto; finalmente, durante los últimos 10 min de la sesión, el animal fue recompensado cada vuelta completa realizada en el sentido correcto. Luego de esto el animal fue devuelto a su jaula hasta el día siguiente.

### **2.2.1.3. Cuantificación del comportamiento**

A continuación el animal fue sometido a una serie de sesiones diarias durante 1, 3, 5 ó 7 días consecutivos (S1 a S7), dependiendo de los objetivos del experimento. En cada sesión se registró automáticamente la cantidad de vueltas realizadas en el sentido correcto y el tiempo empleado. Se estableció como criterio para finalizar la sesión la ejecución de un número determinado de vueltas. De este modo, era necesario que el animal realizara 100 vueltas en las primeras 3 sesiones (S1 a S3) y 150 vueltas en las últimas 4 sesiones (S4 a S7), teniendo un tiempo máximo de 30 min. Si el animal no completaba las vueltas requeridas para cada sesión en 30 min, la misma se daba por concluida. Los datos de cada sesión, número de vueltas, tiempo empleado y cualquier otra observación, fueron registrados en una planilla. Luego, el número de vueltas realizadas fue dividido por el tiempo empleado y así se obtuvo el promedio de velocidad en vueltas por min (intensidad o velocidad de giro) desarrollado por el animal a lo largo de la sesión (Vps).

Otras variables utilizadas en el presente trabajo fueron: Vp que es la velocidad promedio alcanzada a lo largo de las 7 sesiones, se obtiene de promediar los valores de Vps. También la velocidad máxima (Vm) que es la máxima Vps alcanzada por el animal, en general obtenida en la última sesión.

Por último, dado que el test incluye un componente de aprendizaje asociativo (el animal aprende a girar en un sentido y no en el otro para recibir la recompensa), en algunos

experimentos fue evaluada una variable que permita interpretar este componente. Para ello, se cuantificó el número de errores cometidos por el animal. Un error fue definido como la realización de una vuelta en el sentido contrario al recompensado. La sumatoria del número de errores de cada sesión permite calcular, a su vez, el número de errores acumulados (EA).

#### **2.2.1.4. Animales controles**

Los animales usados como controles experimentales fueron sometidos al mismo esquema de deprivación hídrica. Cada animal control recibió una ración diaria de agua equivalente al promedio de ingesta hídrica de los animales entrenados en el lote experimental correspondiente. Un segundo grupo control, además de la deprivación hídrica, fue colocado en el aparato de entrenamiento pero no recibió entrenamiento ni recompensa. El comportamiento del animal control fue registrado. El tiempo que cada animal control permaneció dentro del aparato en cada sesión de entrenamiento fue equivalente al promedio de permanencia de los animales entrenados en ese lote experimental en dicha sesión.

#### **2.2.1.5. Criterios de descarte**

Todos los animales fueron pesados en forma diaria y aquellos animales cuyo peso disminuyó más del 15% desde el primer día de entrenamiento fueron descartados del experimento. Del mismo modo, se descartó a aquellos animales que en la primera sesión realizaron menos de 15 vueltas o menos de 40 vueltas en la segunda sesión. Los animales que superaron dicho criterio generalmente respondieron en las siguientes sesiones de manera similar al promedio de respuesta del resto del grupo experimental. De todos modos, los animales que no alcanzaron a realizar 100 vueltas en la tercera sesión o no superaron las 120 vueltas en ninguna de las sesiones restantes también fueron separados.

#### **2.2.1.6. Esquemas de entrenamiento y tiempos de sacrificio**

Dado los distintos interrogantes planteados en el presente estudio, los tiempos de entrenamiento y de sacrificio varían según el objetivo experimental particular de cada análisis. De este modo, los diferentes entrenamientos en el TEC se realizaron bajo distintos esquemas para poder evaluar el efecto de las variables del test relacionadas con los parámetros neuroquímicos de interés que fueron evaluados posteriormente. Del mismo modo, luego del entrenamiento, el tiempo de sacrificio varió en función de priorizar el estudio de los cambios inmediatos producidos por la actividad funcional o el análisis de las modificaciones neuroquímicas que quedarán establecidas a largo plazo. Un procedimiento general a lo largo de los distintos experimentos fue partir de más de una camada de animales y distribuir de manera proporcional a los animales de distintas camadas entre los distintos grupos experimentales de forma de evitar los efectos de camada.

##### **2.2.1.6.1. Entrenamiento a distintas edades**

Para determinar si los cambios neuroquímicos están relacionados con la edad en que se entrena, se realizó un TEC (S0-S7) con ratas machos de la cepa Sprague-Dawley que tenían 20, 30, 40, 60, 90 a la fecha de inicio del entrenamiento. Los animales entrenados y controles fueron sacrificados 3 meses después del entrenamiento.

##### **2.2.1.6.2. Estudios a distintos tiempos post-entrenamiento**

En estos experimentos, ratas machos de la cepa Sprague-Dawley fueron entrenados en el TEC (S0-S7) a partir de los 30 días de edad. Luego del entrenamiento los animales fueron divididos en grupos de manera que los distintos grupos fueran similares en cuanto a la respuestas motoras de sus integrantes en las pruebas. Se dividieron los animales controles en la misma cantidad de grupos. Finalmente, un grupo entrenado y un grupo control fue sacrificado periódicamente a distintos tiempos: 15, 30, 60, 90, 180, 360 días luego del entrenamiento.

#### **2.2.1.6.3. Comparación de la respuesta de machos y hembras**

Con el objeto de comparar la respuesta al TEC de los dos sexos, animales de la cepa Sprague-Dawley de 20, 30, 40 y 60 días fueron subdivididos según el sexo, entrenados (S0-S7) y sacrificados a los 3 meses con sus respectivos grupos controles.

#### **2.2.1.6.4. Comparación de la respuesta de distintas cepas animales**

El TEC se realizó (S0-S7) en ratas machos de la cepa Sprague-Dawley y Wistar de 30 días de edad al comienzo del entrenamiento. Los animales fueron sacrificados a los 3 meses de edad.

#### **2.2.1.6.5. Estudio del entrenamiento en distintos meses del año**

Animales machos de la cepa Sprague-Dawley de 30 días de edad al S0 fueron entrenados en el TEC (S0-S7) a mediados de los distintos meses pares del año y sacrificados a los 3 meses.

#### **2.2.1.6.6. La respuesta motora y el sentido de giro**

En estos experimentos, animales machos de la cepa Sprague-Dawley y Wistar fueron entrenados a partir de los 30 días de edad en el TEC (S0-S7) dividiéndolos en 2 grupos experimentales. Unos fueron recompensados cuando giraban en el sentido horario y los otros cuando giraban en el sentido antihorario. Fueron sacrificados a los 40 días post-entrenamiento.

#### **2.2.1.6.7. Distintas sesiones de entrenamiento**

Animales machos y hembras de la cepa Sprague-Dawley y machos de la cepa Wistar fueron entrenados a partir de los 30 días de edad con distintos esquemas. Un grupo realizó las sesiones S0 a S1, otro de S0 a S3, otro de S0 a S5 y el último grupo experimental de S0 a S7. Fueron sacrificados a los 40 días post-entrenamiento

## **2.2.2. Test del Disco Giratorio**

### **2.2.2.1. Diseño del equipo**

El disco giratorio fue diseñado y construido de forma de mantener la mayor similitud posible con el aparato del TEC. Una plancha circular fue recubierta con goma antideslizante, colocada sobre una base de madera y rodeada de dos cilindros concéntricos, uno interno y otro externo. Todos los componentes guardaron las mismas dimensiones que los utilizados para el TEC. Esta estructura, finalmente fue colocada sobre una carcasa correspondiente a un aparato tocadisco cuya velocidad de giro fue modificada de tal manera que permitiera un movimiento de la estructura en el sentido horario de 13 rpm. Una marca blanca fue hecha en una posición cualquiera, del lado interno y del lado externo del cilindro externo y fue utilizada como referencia durante el proceso de entrenamiento. El aparato también fue iluminado con luz blanca homogénea.

### **2.2.2.2. Procedimiento de entrenamiento**

Los animales fueron colocados en el interior del aparato e inmediatamente el sistema giratorio encendido de manera que la plataforma comenzara a girar. Los animales muestran una respuesta no condicionada frente a este movimiento y comienzan a caminar y luego a correr en el sentido contrario al movimiento de la plataforma. Cada animal fue sometido a un esquema de sesiones diarias (1, 3, 5 ó 7) en las cuales personalmente el operador controlaba el número de vueltas realizadas. Se computaba una vuelta cada vez que el animal traspasaba en el sentido contrario de giro de la plataforma, la línea blanca de referencia marcada sobre el cilindro externo. Al igual que en el TEC, cada sesión del TDG finalizaba cuando el animal cumplía el número de vueltas esperadas (100 vueltas durante las sesiones 1 a 3, 150 vueltas durante las sesiones 4 a 7) o cuando transcurrían 30 min desde el inicio de la sesión. El número de vueltas, tiempo y velocidad de giro para cada animal fueron registrados en una planilla. Los animales que no mostraban la respuesta al movimiento de la plataforma durante la primera sesión fueron descartados. En todo momento, los animales dispusieron en sus



jaulas, de agua y comida *ad libitum*. Los animales controles fueron colocados en el aparato pero sin movimiento de la plataforma.

### **2.2.2.3. Criterio de descarte**

La respuesta al movimiento es una respuesta no estimulada por el operador de manera que puede observarse, en contadas ocasiones, animales que no muestran una respuesta motora activa durante la sesión. En esos casos se observa que el animal se queda estático en un sector del disco y gira del mismo modo que la plataforma sin realizar un movimiento propio sobre la superficie. Dichos animales fueron descartados del experimento.

### **2.2.2.4. Esquemas de entrenamientos y tiempos de sacrificio**

#### **2.2.2.4.1. Entrenamientos para estudios del efecto a largo plazo**

Al igual que para el TEC, algunos experimentos con esquemas de entrenamiento y tiempos de sacrificio diferentes se diseñaron con el TDG.

##### **2.2.2.4.1.1. Distintos tiempos post-entrenamiento**

En estos experimentos, ratas machos de la cepa Wistar fueron entrenados en el TDG (S1-S7) comenzando a los 30 días de edad. Luego del entrenamiento los animales fueron divididos en grupos de manera que los distintos grupos fueran similares en cuanto a la respuestas motoras de sus integrantes en las pruebas. Se dividieron los animales controles en la misma cantidad de grupos. Finalmente, un grupo entrenado y un grupo control fue sacrificado periódicamente a distintos tiempos: 40, 90, 180 días post-entrenamiento.

##### **2.2.2.4.1.2. Distintas sesiones de entrenamiento**

Animales machos de la cepa Wistar fueron entrenados a partir de los 30 días de edad con distintos esquemas. Un grupo realizó las sesiones S1 a S2, otro de S1 a S5 y otro de S1 a S7. Finalmente fueron sacrificados a los 40 días post-entrenamiento.

#### **2.2.2.4.2. Entrenamientos para el estudio de los cambios inmediatos**

En esta batería de experimentos, los animales fueron entrenados y sacrificados en forma inmediata (minutos en lugar de meses). Animales machos de la cepa Wistar fueron entrenados en el TDG durante una única sesión (S1) a partir de los 30 días de edad. Se daba por concluida la sesión cuando el animal recorriera 150 vueltas o cuando transcurrieran 30 minutos desde el inicio del entrenamiento. Luego del ejercicio en el TDG, los animales fueron sacrificados, junto con los controles, a los 30 ó 60 min de completada la segunda sesión.

### **2.3. OBTENCION DEL TEJIDO PARA ESTUDIOS NEUROQUIMICOS**

#### **2.3.1. Disección del Sistema Nervioso**

En los tiempos indicados en cada diseño experimental, los animales fueron sacrificados rápidamente por decapitación con guillotina. Luego se realizó, en forma inmediata, un corte longitudinal de la piel en la línea media del cráneo y la misma fue removida dejando al descubierto la calota. Posteriormente se hizo un corte con alicate de la parte posterior del hueso occipital, se introdujo una espátula de punta roma entre la membrana aracnoide y la piamadre a fin de que entre aire en el espacio subaracnoideo y poder así introducir el alicate sin dañar el cerebro. A continuación se realizaron dos cortes longitudinales de la calota a la altura de la comisura párieto-occipital del lado izquierdo y derecho, y la parte superior de la calota fue removida. Introduciendo una espátula en el sentido póstero-anterior por delante de los lóbulos frontales, el cerebro fue levantado hacia atrás, retirado de la cavidad encefálica, colocado en un vaso de precipitado con solución fisiológica a 0 °C y enfriado a -20 °C durante 2 min.

A continuación, el cerebro fue puesto con la cara ventral hacia arriba sobre una cápsula de Petri cubierta con papel de filtro y ubicada sobre hielo. Se realizaron 3 cortes transversales con una hoja de afeitar o un bisturí, uno por delante de los tubérculos olfatorios, otro por detrás de los mismos y otro entre los lóbulos occipitales y el

cerebelo. Luego, las distintas áreas a estudiar fueron disecadas con espátulas. Así el cerebro quedó dividido en tres porciones y, a parte, el cerebelo. De la parte anterior del cerebro, correspondiente a los lóbulos frontales, se disecó la corteza frontal. De la parte media fueron disecados ambos cuerpos estriados, izquierdo y derecho, y la corteza motora (también respetando la lateralidad). Finalmente, de la porción posterior se disecaron el hipocampo, los núcleos amigdalinos y la corteza occipital.

### **2.3.2. Fraccionamiento subcelular**

Luego de la disección las distintas áreas del cerebro fueron rápidamente pesadas y fraccionadas para obtener las distintas fracciones subcelulares según Azcurra y De Robertis (13), con ligeras modificaciones (figura 7). El tejido fue homogeneizado al 5% (p/v) en solución fría de buffer 20 mM Tris-HCl, 0.32 M de sacarosa, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, pH 7.4, en hielo, en un homogeneizador polytron de vidrio con vástago de teflon (clearance 0.28 mm) mediante 40 pases a 1300 rpm. El homogenato se centrifugó 10 min a 1090 x g promedio, el pellet se lavó dos veces y se descartó. Los sobrenadantes post-nucleares se mezclaron y centrifugaron a 13000 x g durante 30 min y, luego de dos lavados, el sobrenadante fue descartado. El pellet obtenido luego de los lavados **Sinaptosomas**. Para los estudios que utilizan esta fracción, el pellet fue resuspendido en el mismo buffer de homogeneización que contenía además 0.02%  $\text{NaN}_3$ , fraccionado en alícuotas y guardado en freezer a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su posterior uso.

En ciertos casos, el sobrenadante de la fracción sinaptosómica fue centrifugado a 105000 x g prom durante 120 min. Luego de un lavado se conservó el pellet, **Microsomas**, y el sobrenadante, **Citosol**.

En algunos experimentos la fracción sinaptosómica fue resuspendida en una solución hipo-osmótica de 5 mM Tris-HCl, 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 8.1, vertido nuevamente en el homogeneizador de polytron donde se realizaron 30 pases del vástago de teflon. El objetivo fue la ruptura por shock osmótico de los sinaptosomas sellados presentes en la fracción precedente.

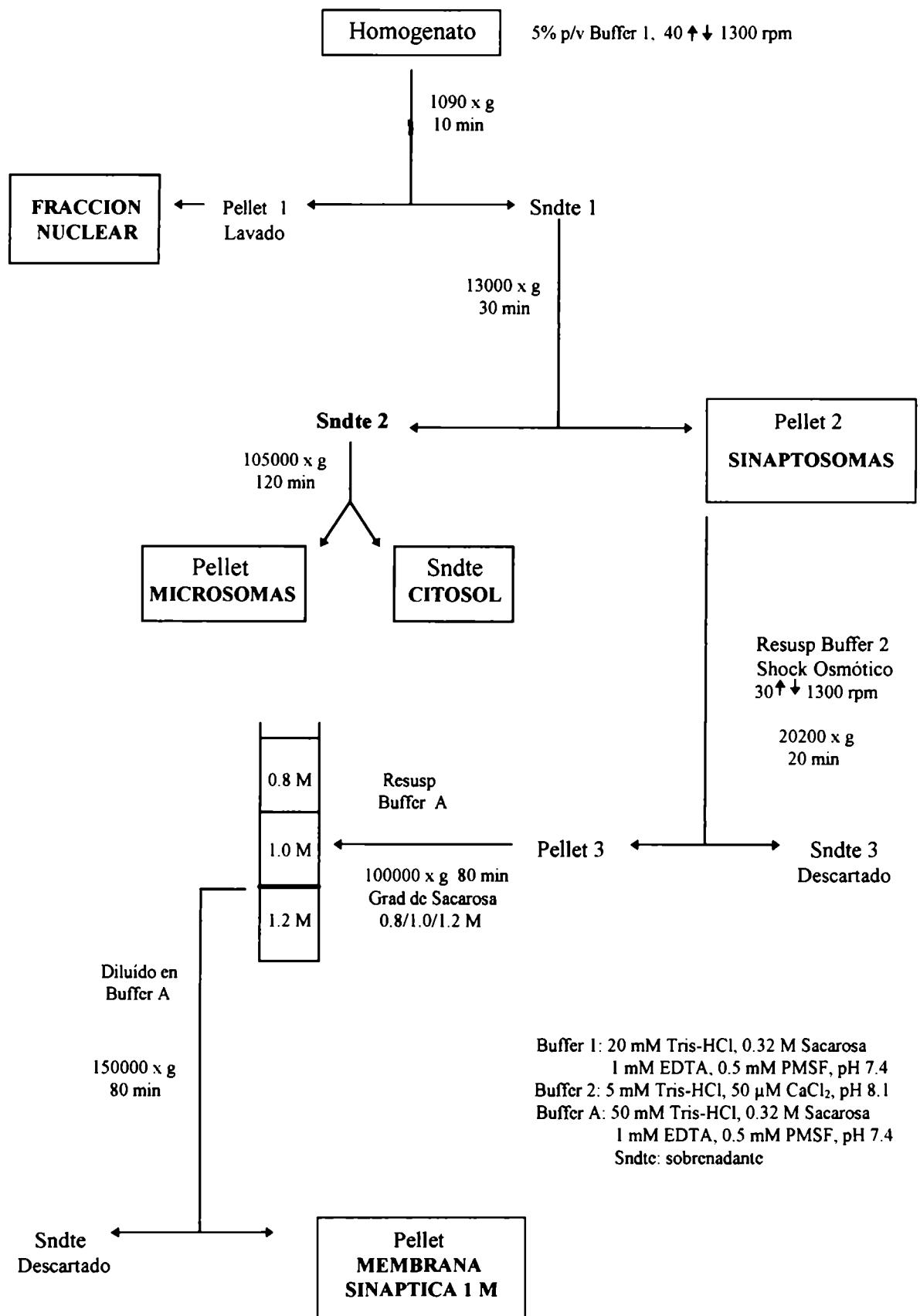


Figura 7. Esquema del fraccionamiento subcelular.

Luego del shock osmótico, el nuevo homogenato fue centrifugado durante 30 min a  $20200 \times g$  prom. Luego de un lavado, el pellet fue resuspendido en 1 a 2 ml de buffer de homogeneización y cargado sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 0.8M / 1.0M / 1.2M en buffer de homogeneización, formado por 2.5 ml de cada capa del gradiente. Los gradientes fueron centrifugados a  $100000 \times g$  prom durante 80 min. Se recuperó la banda en la interfase 1.0M/1.2M y el tejido fue resuspendido en un dounce con 30 pases del vástago, diluido en buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.4, Sacarosa 0.32M, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF) y centrifugado a  $150000 \times g$  prom durante 80 min. El pellet fue resuspendido en un pequeño volumen de buffer B (10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Tris-HCl pH 7.4), separado en alícuotas y almacenado a  $-70^\circ C$ . Esta fracción fue denominada **Membrana Sináptica 1M**.

## **2.4. DETERMINACIONES NEUROQUIMICAS**

### **2.4.1. Determinaciones bioquímicas generales**

#### **2.4.1.1. Determinación de acetilcolinesterasa**

La determinación de AchE fue realizada por el método de Ellman (71). Para ello, 40  $\mu$ l de muestra fueron incubados durante 20 minutos con 985  $\mu$ l de buffer fosfato 0.1 M pH 8, 35  $\mu$ l de 0.1 M DTNB, 40  $\mu$ l de  $10^{-5}$  M ethopropazina (inhibidor de la butirilcolinesterasa). A continuación se agregaron 40  $\mu$ l de 15 mM acetiltiocolina y, manteniendo la temperatura a  $37^\circ C$ , se realizó la lectura espectrofotométrica continua a 412 nm durante 3 minutos. La actividad enzimática fue determinada por la degradación de la acetiltiocolina, con exposición del grupo tiol que al reaccionar con el DTNB produce un complejo de coloración amarilla.

La actividad específica relativa de AchE en cada fracción fue determinada, cuando fuera requerido, como:

Actividad de AchE/mg proteína en fracción X

Actividad de AchE/mg proteína en Homogenato

#### **2.4.1.2. Determinación de proteínas**

Se utilizó el método de Lowry y colaboradores (191) empleando el reactivo de Folin y utilizando como estandar BSA (Fracción V).

#### **2.4.2. Medición de neuroreceptores**

##### **2.4.2.1. Evaluación del receptor colinérgico muscarínico**

La cuantificación del receptor colinérgico muscarínico se realizó mediante la técnica de ensayos competitivos empleando como ligando específico el  $^3\text{H}$ -QNB, con una actividad específica de 30-60 Ci/mmol.

##### **2.4.2.1.1. Determinación de la afinidad y número de receptores**

La determinación del número de receptores ( $B_{\text{max}}$ ) por ensayos de saturación se realizó sobre las distintas muestras de tejido obtenidas. Para ello, el tejido (10-20  $\mu\text{g}$  de proteína membrana sináptica 1M; 50-150  $\mu\text{g}$  de proteína para el resto de las fracciones) fue incubado en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, volumen final de incubación 0.5 a 1.0 ml, en presencia de 2 nM  $^3\text{H}$ -QNB durante 30 min a 37 °C bajo agitación. Cada determinación fue realizada por triplicado y la unión inespecífica del ligando al tejido evaluada en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de Atropina por ensayo duplicado.

Para la determinación de la afinidad ( $K_d$ ) y  $B_{\text{máx}}$  en la misma preparación se utilizó la técnica de Scatchard (274), y se incubó la muestra de tejido como se indica para el ensayo de saturación pero, en este caso, con cantidades decrecientes de  $^3\text{H}$ -QNB (1.87 - 0.3 nM). Cada punto de la curva fue evaluado por triplicado y por duplicado el inespecífico.

Luego de la incubación, el ligando unido fue separado del ligando libre utilizando dos métodos diferentes, en una caso se realizó por filtración al vacío y en el otro por centrifugación.

#### **2.4.2.1.2. Técnica de filtración**

El ensayo de unión al ligando específico se realizó mediante la técnica de Yamamura y Snyder (323). Luego de la incubación, el ligando unido se separó del ligando libre por el método de filtración al vacío utilizando un aparato de filtración de 8 bocas tipo Millipore y usando filtros de papel Whatman GF/B, con una velocidad de flujo de 5 ml/min. La incubación se cortó con el agregado de 3 ml de buffer de incubación frío al tubo de ensayo, este se volcó sobre el filtro correspondiente y se lavó 3 veces con 4 ml del buffer de incubación frío. Los filtros se colocaron en un vial y se secaron en estufa a 42 °C durante toda la noche. Los viales se cargaron con 10 ml de líquido de centelleo (0.25 g POPOP y 4 g PPO por cada litro de tolueno bidestilado), fueron mantenidos a 20 °C en oscuridad durante 30 min antes de realizarse la cuantificación de radioactividad remanente en los viales.

#### **2.4.2.1.3. Medición de mAChR como marcador de fracción**

La cuantificación del mAChR utilizando <sup>3</sup>H-QNB también fue utilizada como control de enriquecimiento de fracción durante el fraccionamiento subcelular. La unión específica relativa de <sup>3</sup>H-QNB se calculó como:

$$\frac{\text{CPM/min por mg proteína en fracción X}}{\text{CPM/min por mg proteína en PT}}$$

donde PT es el pellet total obtenido por centrifugación del homogenato a 100000 x g durante 60 min.

#### **2.4.2.2. Determinación del receptor dopaminérgico D1**

Se realizó de acuerdo con la técnica de Dewar y Reader (58). Se incubaron 50 µg de proteína del tejido durante 30 min a 37 °C en un volumen final de 0.5 ml de buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 154 mM NaCl, 10 µg/ml de BSA y el ligando radioactivo (0.05-0.5 nM <sup>3</sup>H-SCH23390 66 Ci/mmol). La reacción se

terminó con 3 ml de buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 154 mM NaCl frío y se realizaron 2 lavados de 10 ml con la misma solución. Para los ensayos de unión inespecífica se incubaron las muestras en presencia de 10  $\mu$ M SCH23390 sin marca radioactiva. La separación del ligando libre y el unido se realizó por filtración.

#### **2.4.2.3. Determinación del receptor dopaminérgico D2**

La determinación del receptor dopaminérgico D2 fue realizada siguiendo el método de Howlett y Nahorski (132). Para los ensayos de saturación 100  $\mu$ g de proteína fueron incubados, por triplicado, en un volumen final de 1 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Luego de una preincubación de 15 min a 37 °C se incubó el tejido a la misma temperatura con 1.6 nM <sup>3</sup>H-Spiperone (15-30 Ci/mmol), bajo agitación. El ensayo de unión inespecífica se realizó, también por triplicado, incubando la preparación con 50  $\mu$ M de sulpirida. Los ensayos de afinidad fueron realizados con concentraciones variables del ligando radioactivo (0.1 - 1.6 nM). La separación del ligando libre del unido fue por filtración y el manejo de los filtros fue realizada en forma similar a la descrita anteriormente.

#### **2.4.2.4. Determinación del receptor glutamatérgico NMDA**

Se realizó por el método de Wong y colaboradores (316), para los ensayos de saturación 150  $\mu$ g de proteína fueron incubados en 1 ml de buffer I (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM Hepes, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucosa, pH 7.4), 5 nM <sup>3</sup>H-MK-801, 22 Ci/mmol. La determinación de la unión inespecífica fue realizada por desplazamiento en presencia de 100  $\mu$ M de MK-801 sin marca radioactiva. La separación del ligando libre del unido fue por filtración y el manejo de los filtros fue realizada en forma similar a la descrita anteriormente.

#### **2.4.2.5. Cuantificación radioactiva**

En todos los casos, luego de la eliminación del ligando libre, la radioactividad remanente fue cuantificada en un contador de centelleo, considerando la eficiencia del



aparato y el quenching, utilizando el método de relación de canales a partir de una curva estándar para tritio.

Las desintegraciones por minuto (DPM) se obtienen conociendo las cuentas por minuto (CPM) que detecta el aparato y la eficiencia (Ef) de conteo a partir de la relación de canales obtenida.

$$\text{DPM} = \frac{\text{CPM}}{\% \text{ Ef}}$$

Las DPM obtenidas a partir de un tubo incubado en presencia del desplazante particular (por ejemplo, atropina 1  $\mu\text{M}$  para el  $^3\text{H}$ -QNB corresponden a la unión inespecífica del ligando al tejido. Incubando en ausencia del desplazante frío se obtienen las DPM totales. Las DPM correspondientes a la unión del ligando al receptor es:

$$\text{DPM receptor} = \text{DPM totales} - \text{DPM inespecífico}$$

La cantidad molar correspondiente a las DPM de cada medición se calculan a partir de la actividad específica del ligando utilizado. Los resultados se expresan en fmoles receptor/ mg proteína.

#### **2.4.3. Estudios de fosforilación *in vitro***

Analogamente a lo realizado por Burgoyne (34, 35), se fosforilaron preparaciones de membranas sinápticas (10-20  $\mu\text{g}$  de proteína) de animales controles y entrenados para evaluar cambios de binding en el mAChR por fosforilación, en condiciones que activan pKC y en ausencia de dichas condiciones. Para ello, se sacrificaron controles y animales entrenados en el TDG, 30 minutos después de finalizada la sesión S2. El tejido fue

incubado en buffer A en presencia, además, de 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 10 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y 25  $\mu\text{g/ml}$  de calmodulina, en un volumen final de 40  $\mu\text{l}$ . En algunas preparaciones no se agregó calcio, magnesio ni calmodulina.

Las muestras fueron preincubadas a 4 °C durante 35 min para permitir la interacción de la calmodulina con las membranas y, posteriormente, a 37 °C durante otros 5 min para activar los sistemas de fosforilación. Luego, cada muestra fue incubada a 37 °C durante 5 min en presencia o ausencia de ATP (100  $\mu\text{M}$  de concentración final). Terminada la incubación, se agregó 200  $\mu\text{l}$  de buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.4 y se centrifugó en microfuge a 13000 x g máx a 4 °C durante 12 min. El pellet fue resuspendido en el mismo buffer y sobre esta muestra se procedió a la cuantificación del mAChR.

#### **2.4.4. Análisis de la expresión del ARN del mAChR**

La técnica de RT-PCR permite el estudio de la expresión de ARN con primers específicos a partir de dos pasos sucesivos. En el presente trabajo, mediante esta metodología se estudió la expresión del ARN de los dos principales subtipos del mAChR involucrados en la regulación colinérgica del cuerpo estriado, el subtipo M1 y M4. En primer lugar se realizó un ADN copia del ARN extraído y posteriormente una amplificación por PCR a partir del ADN copia. En el caso de una amplificación negativa por RT-PCR hubiera sido difícil determinar si la falla técnica se encontraba en el primer paso, preparación del ADN copia o en los pasos propios de la amplificación.

Por este motivo, se creyó conveniente, para la puesta a punto de la técnica, evaluar la capacidad de amplificación de los primers sobre el ADN genómico y asegurar así la eficiencia de la amplificación.

##### **2.4.4.1. Extracción de ADN de corteza cerebral**

El ADN genómico fue extraído de corteza cerebral total de rata por el método clásico de Gross-Bellard y colaboradores (111), con ligeras modificaciones. El tejido disecado fue congelado rápidamente a -35 °C y cortado finamente con una gillete. Posteriormente, se incubó toda la noche a 55 °C con proteinasa K (1 mg/ml) en buffer de digestión: 100

mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.5% SDS. Luego de dos extracciones en fenol Tris pH 8-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) en tubos corex, se centrifugó a 1700 x g prom por 10 min. La fase superior acuosa fue transferida y se agregó 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol 100% para precipitar el ADN. Una vez precipitado se centrifugó brevemente y el sobrenadante fue decantado. El pellet fue lavado con etanol 70% y secado al aire. Finalmente el ADN fue resuspendido en buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8). La cuantificación espectrofotométrica de la concentración de ADN permitió calcular un rendimiento de aproximadamente 1.6 mg de ADN por mg de tejido, considerando que una unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/ml de ADN doble cadena. La evaluación de la relación de absorvancia 260/280 (1.87) indicó un buen índice de pureza del ADN.

#### **2.4.4.2. PCR del ADN extraído**

Utilizando los primers específicos para los subtipos M1 y M4 del mAChR, se amplificó el ADN genómico. Los primers utilizados fueron los siguientes: M1, 5'-GCA CAG GCA CCC ACC AAG CAG-3' (primer superior extremo 5', posición 1073) y 5'-AGA GCA GCA GCA GGC GGA ACG-3' (primer inferior extremo 3', posición 1425) con un producto de PCR de 373 pb correspondiente al número de secuencia M 16406 del Genbank; y M4, 5'-TGG GTC TTG GCC TTT GTG CTC-3' (primer superior extremo 5', posición 461) y 5'-TTC ATT GCC TGT CTG CTT TGT TA-3' (primer inferior extremo 3', posición 1026) con un producto de PCR de 588 pb correspondiente al número de secuencia M 16409 del Genbank. Estos primers específicos de los subtipos del receptor muscarínico fueron diseñados usando un programa de síntesis de oligonucleótidos basados en la secuencia publicada de los genes del receptor muscarínico (27).

Los primers fueron cuantificados espectrofotométricamente a 260 y 280 nm luego de una dilución 1/200 para establecer con mayor exactitud la concentración de partida.

La amplificación por PCR se realizó en primer lugar respetando los pasos descritos por Wei y colaboradores (307), 25-40 ciclos a 95 °C 1 min, 62 °C 1 min. Con una mezcla por tubo (50µl) compuesta por buffer Promega libre de magnesio (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9, 0.01% TX-100), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, primers (c/u 0.5 µM) , Taq polimerasa promega 1 U.

En la mayoría de los casos, se encontraron problemas de amplificación o baja eficiencia, por lo que se realizaron algunas modificaciones en forma sucesiva, en los ciclos y temperaturas de amplificación, la concentración de primers y Taq polimerasa. En el caso de la amplificación del subtipo M2 y M4 se realizaron amplificaciones con mayor concentración de Mg<sup>++</sup> (MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM) y en presencia de formamida debido a la existencia de annealing entre ambos primers que disminuían la eficiencia de amplificación.

El protocolo final de amplificación fue el siguiente:

ADN 100 ng

Buffer Kit Perkin Elmer

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (M1), 2.5 mM (M2, M4)

dNTPs 0.2 mM

primers 1 µM (c/u)

Taq polimerasa 1.5 U

Temperaturas de amplificación: 5' 94 °C; ciclos de 45" a 94 °C, 1' a 60 °C y 30" a 72 °C; 5' a 72 °C.

Número de ciclos: 25 para M1, 35 para M2 y M4.

La evaluación posterior del producto de amplificación fue realizada a través de una corrida electroforética en gel de agarosa 1.8% con bromuro de etidio para visualizar las bandas.

Las corridas electroforéticas fueron fotografiadas sobre transiluminador de luz U.V. de 300 nm, usando una cámara Polaroid MP-4 provista de un filtro rojo con película Polaroid 667.

#### **2.4.4.3. Extracción de ARN**

Dado el bajo nivel de ARNm de mAChR y la necesidad de obtenerlo altamente intacto, para determinar el procedimiento óptimo, se evaluaron distintas modificaciones de la técnica de extracción de Chomczynski y Sacchi (40).

El tejido fue homogeneizado en una solución desnaturalizante (4 M tiocianato de guanidina; 25 mM citrato de sodio; 0.1 M 2-mercaptoetanol; 0.5% lauril-sarcosina) con homogeneizador de cuchilla metálica a 15000 rpm durante 30 seg.

El paso siguiente fue una extracción por agregado secuencial de NaAcO, fenol saturado en agua y cloroformo-alcohol isoamílico (49:1 v/v). Siguió dos precipitaciones con un volumen de alcohol isopropílico y dos lavados con etanol 75%. El pellet final fue resuspendido en agua libre de RNAsas, cuantificado y alicuoteado a -20 °C hasta su uso.

El ARN fue cuantificado espectrofotométricamente a 260 nm considerando una unidad de densidad óptica equivalente a 40 µg/µl de ARN. La relación de absorvancia 260/280 fue utilizada para determinar el índice de pureza.

#### **2.4.4.4. Producción de ADN copia a partir del ARN extraído**

La transcripción reversa del ARN se realizó con dos primers diferentes, usando hexámeros al azar y usando poliT, mientras que el resto de las condiciones de incubación se mantuvieron iguales. Los resultados más reproducibles se consiguieron con hexámeros al azar.

Las condiciones establecidas para la producción del ADN copia fueron las siguientes:

- .Preparación del master mix: ARN 1 µg, dNTPs 1 mM, hexámeros al azar (Biodynamics) 2.5 µM, DTT 0.01M, RNasin (Promega) 300 U, vol final 19 µl.
- .Calentamiento 10 min a 65 °C para desnaturalizar el ARN
- .Spin de centrifugación para eliminar desechos insolubles
- .10 min a temperatura ambiente (annealing)
- .Transcripción reversa: se agregan 5 µl buffer BRL y 1.2 µl (300 U) de RT-transcriptasa reversa y se incuba 60 min a 35 °C.
- .Se inactiva 5 min a 95 °C y se conserva el ADN copia a -20 °C

El ADN copia es corrido por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE durante 1 hora a voltaje constante (70V).

Para el chequeo de la calidad del ADN copia se realizó una transcripción utilizando un nucleótido radioactivo. El producto fue corrido en electroforesis como se describe anteriormente, el gel se secó en una secadora BioRad por vacío y calor y fue expuesto sobre una película radiográfica y placas intensificadoras a -70 °C durante toda la noche.

#### **2.4.4.5. RT-PCR**

Los animales entrenados a los 30 días de edad durante 7 días en el test de entrenamiento motor fueron sacrificados a los 90 días de edad. La corteza motora izquierda y derecha y el cuerpo estriado izquierdo y derecho fueron disecados, y el ARN extraído como se indica en el punto 2.4.4.3.

Posteriormente, el ARN es incubado 30 min a 37°C con 2 U de DNAsa libre de RNAsa (Bethesda Research Labs) para eliminar residuos de ADN genómico. Finalmente, el ADN copia del ARN extraído se obtiene como se indica en 2.4.4.4.

El ADN copia fue incubado con los distintos sets de primers específicos, para M1, M2 y M4, en las condiciones establecidas en 2.4.4.2.

Como controles positivos se utiliza la amplificación de ADN genómico en las mismas condiciones y como negativo se amplifica el ARN sin transcripción reversa y en otro tubo se realizó la amplificación sin agregar ningún tipo de molde (ADN o ARN).

#### **2.4.4.6. Separación del producto de PCR por Electroforesis**

Posteriormente a la amplificación, entre 5 y 30  $\mu$ l de los productos de amplificación por PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 1.8% en buffer 1x TBE, 25  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio y 0.1% azul de bromofenol. Una calle del gel contiene un estándar de peso molecular de ADN. Las distintas bandas fueron visualizadas por fluorescencia y fotografiadas.

#### **2.4.4.7. Cuantificación del producto de PCR**

La interpretación de esta técnica fue realizada por distintos métodos aceptados para la evaluación cualitativa y semicuantitativa de la PCR (142). Por observación directa de la intensidad de banda de bromuro de etidio para cada producto y por cuantificación de  $^{32}\text{P}$  incorporado en el producto de PCR proveniente de un primer fosforilado en 5'.

##### **2.4.4.7.1. Interpretación cualitativa por visualización directa**

En este caso la determinación se realizó directamente sobre el gel y a partir de la observación de las imágenes fotográficas obtenidas del mismo. Por este método se determinaron las diferencias relativas entre las bandas en función de la emisión lumínica del bromuro de etidio. Este colorante fluorescente se intercala en el ADN en forma proporcional a la cantidad del ácido nucleico y al ser iluminado con luz UV emite fluorescencia en el espectro de luz visible.

##### **2.4.4.7.2. Análisis semi-cuantitativo del producto amplificado**

Este método es más sensible que el anterior y permite cuantificar el producto amplificado. Al utilizar uno de los primers con el extremo 5' marcado con  $^{32}\text{P}$ , en cada ciclo de amplificación se incorpora marca radioactiva en función de la generación de

una copia de la secuencia amplificada. La cantidad de producto, por lo tanto, es proporcional a la cantidad <sup>32</sup>P. Luego de la corrida electroforética, se corta la banda del gel y, sin eluir el ADN, se coloca en un vial y se cuantifica la radioactividad en un contador de centelleo.

#### **2.4.5. Inmunohistoquímica**

El cerebro de los animales entrenados y controles que fueron utilizados para estudios inmunohistoquímicos fue sometido a un proceso de fijación, en forma inmediatamente posterior al sacrificio del animal. Luego de la fijación y procesamiento del material, se obtuvieron cortes micrométricos del tejido cerebral y se estudió la presencia de las moléculas de interés a través de anticuerpos específicos.

##### **2.4.5.1. Fijación del tejido**

Una vez anestesiados profundamente por administración intraperitoneal de pentotal, los animales fueron sujetos con alfileres sobre una tabla de telgopor, colocada dentro de una bandeja de acero inoxidable, con sus extremidades abiertas de manera de permitir un acceso fácil al tórax. El tórax fue abierto y el corazón y las venas principales expuestas luego de remover el timo en los casos que obstaculizaba el procedimiento. Se realizó una incisión en el ventrículo izquierdo para insertar una cánula. La cánula fue conectada a un tubo, que a través de una orqueta, conectaba con dos frascos situados a una altura de 80 cm. Dicha altura permitía una velocidad de flujo adecuada para realizar una rápida perfusión sin que la presión del líquido altere el sistema circulatorio del animal. Uno de los frascos contenía buffer fosfato 0.1M y en el otro una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en el mismo buffer. Un juego de clamps permitía cambiar de un líquido de perfusión al otro. Para preparar la solución de PFA 4%, se llevó el agua a ebullición y se mezcló bajo campana con el PFA. Luego de enfriado y filtrado se agregó el buffer. La fijación se inició con la perfusión del buffer fosfato y se continuó hasta que no se el animal dejó de perder más sangre, aproximadamente 250 ml. A continuación se perfundió con la solución de



paraformaldehído haciendo circular un volumen total de 500 ml en aproximadamente 20 min.

Luego de la fijación por perfusión, el animal fue descapotado y el cerebro disecado con cuidado para no afectar la estructura externa que sería, posteriormente, utilizada como guía para seleccionar la zona de cortes. Se colocó el cerebro en solución de PFA 4% toda la noche a 4 °C envuelto en una gasa.

#### **2.4.5.2. Procesamiento y cortes histológicos**

Al día siguiente se lavó el cerebro con agua corriente durante 10 min para colocarlo luego en sacarosa al 30% hasta que se embebió completamente, aproximadamente 48 horas. Luego de este proceso, el cerebro fue congelado 30 seg en una mezcla de isopentano-hielo seco a - 80 °C, envuelto en aluminio y guardado a - 20 °C hasta el día siguiente. Para la realización posterior de las técnicas inmunohistoquímicas se realizan cortes de distinto espesor, entre 5 a 40 µm, en un crióstato.

Los cortes fueron montados sobre portaobjetos pretratados con adhesivo tisular (1 g de gelatina y 0.1 g de  $KCr(SO_4) \cdot 12 H_2O$  en 100 ml de agua destilada).

#### **2.4.5.3. Detección inmunohistoquímica de NF, GFAP y c-fos**

Los cortes fueron lavados en en PBS 0.02M pH 7.4 durante 5 min y luego en una solución al 1% de  $H_2O_2$  en metanol durante 30 minutos. Esta última incubación fue realizada a fin de inhibir la peroxidasa endógena que pueda estar presente en el tejido. Este paso es importante ya que el sistema de revelado involucra la utilización de peroxidasa, si la peroxidasa endógena no fuera desactivada la aparición de reacción positiva podría sugerir falsamente la presencia de la molécula en estudio. Luego del bloqueo de la peroxidasa endógena el tejido fue lavado 5 min en PBS 0.02M y posteriormente colocado durante 5 min en PBS-T (PBS 0.02M, gelatina 2 por mil, y Tx-100 0.25%). A continuación, fue incubado 16 horas en una cámara húmeda y a 4° C con el anticuerpo primario diluído en PBS-T, en presencia además de 0.5% de BSA, 0.02%

NaN<sub>3</sub>. Las características de los anticuerpos utilizados y las diluciones de incubación fueron las siguientes:

NF: Neurofilamento 68-200 kD monoclonal de ratón Biogenex 2F11-MU073-UC, dil 1/100

GFAP: monoclonal de ratón Biogenex GA5-MU020-UC, dil 1/500

c-fos: policlonal de conejo (5 µg/ml), dil 1/20

El anticuerpo primario fue eliminado con 4 lavados de 15 min con PBS-T. A continuación se incubó 2 hs a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario. Se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado diluido 1/100 en PBS-T, excepto para la detección de c-fos donde se utilizó el anticuerpo secundario biotinilado del kit de detección Vectastain Elite, siguiendo las indicaciones del prospecto. Luego de 2 lavados de 10 min cada uno en PBS-T, el tejido fue incubado otras 2 hs a temperatura ambiente con estreptavidina-peroxidasa dil 1/200 en PBS-T. Nuevamente la detección inmunohistoquímica de c-fos es la excepción ya que la incubación fue realizada con el complejo de detección del kit Vectastain Elite, preparado 30 min antes de su uso. Para ello, se mezcló el reactivo A (estreptavidina) y el B (peroxidasa biotinilada) en iguales proporciones en PBS 10 mM. La incubación en este reactivo fue detenida con 2 lavados de 5 min, uno en PBS-T y el segundo con PBS 0.2 M. Luego se incubó el material en presencia del sustrato cromógeno y se procedió a realizar el revelado. La mezcla de la reacción reveladora comprendía: diaminobenzidina al 0.05% (p/v), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.005% en 100 ml de PBS 20 mM. La incubación fue realizada bajo microscopio entre 2 y 10 min y fue finalizada cuando, a juicio del observador, se hubiera logrado una diferenciación entre la marca específica y el fondo. Posteriormente, se lavó con PBS 0.02M 5 min y luego con buffer fosfato 0.12 M 5 min. Se realizó la contratinción utilizando el colorante citoplasmático verde rápido al 1% o la coloración nuclear con hematoxilina en forma muy suave. Los cortes fueron secados al aire, deshidratados en

concentraciones crecientes de etanol (50%, 96% y 100%) y finalmente en xileno para luego cubrirlos con un cubreobjetos montado con Bálsamo de Canadá.

#### **2.4.5.4. Consideraciones para los ensayos inmunohistoquímicos**

Como control para los estudios de inmunomarcación de c-fos, se utilizaron animales a los cuales se les inyectó previamente metrazol intraperitoneal (50 mg/kg), una droga convulsivante que se conoce que dispara la expresión del c-fos (209). Los animales controles y entrenados fueron sacrificados, respectivamente, 3 hs después de la administración de metrazol o del entrenamiento.

Los animales sobre los que se hicieron inmunomarcaciones para NF y GFAP fueron sacrificados 50 días después de realizados los entrenamientos.

## **2.5. ANALISIS ESTADISTICO**

De resultar necesario someter los datos experimentales obtenidos a un análisis estadístico se utilizó el Test de Student de dos colas o el análisis de varianza ANOVA. El mismo se adecuó a las características de los datos analizados, ya sean mediciones únicas, repetidas o distinto número de variables. De encontrarse diferencias significativas en el análisis con más de dos grupos, se procedió a realizar el test a posteriori de Bonferroni, Dunnet o Tukey según corresponda. Los cálculos fueron realizados siguiendo el texto de Kirk (151).

## **RESULTADOS**

### **3.1. EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO EN LOS TESTS**

### **3.2. CONDICIONES DEL TEJIDO PARA ESTUDIOS NEUROQUIMICOS**

### **3.3. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LOS PARAMETROS NEUROQUIMICOS**

*«No se descubren nuevas tierras sin  
aceptar perder de vista la costa por un  
largo tiempo» André Gide.*

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO EN LOS TESTS**

##### **3.1.1. Estudios en el TEC**

Las pruebas conductuales representan en este modelo experimental el mecanismo de inducción de una respuesta fisiológica en los animales, mientras que el principal objetivo está centrado en los estudios neuroquímicos posteriores. Sin embargo, la alta complejidad de la actividad desarrollada durante los tests determina que sea importante prestar atención al comportamiento de los animales durante el entrenamiento. Cualquier comparación e inferencia que se realice respecto a los cambios neuroquímicos que puedan desencadenarse por la actividad en el TEC o en el TDG en cualquiera de los distintos grupos experimentales deberá, en primer lugar, evaluar si el comportamiento en las pruebas comportamentales fue similar o no entre los grupos.

##### **3.1.1.1. Evaluación del comportamiento motor y el aprendizaje asociativo**

Durante el TEC el comportamiento motor fue evaluado mediante el conteo del número de vueltas y de la velocidad de giro. Si bien el número de vueltas puede ser regulado por el experimentador ya que cumplido cierta cantidad el animal es retirado del TEC, la velocidad de giro es absolutamente independiente del operador y está relacionado con la respuesta de cada animal durante el entrenamiento. Por otra parte, aún reconociendo que el aprendizaje es un proceso sumamente complejo, aquí se seleccionó una variable que permita evaluar de la manera más precisa posible este componente del comportamiento en el TEC.

##### **3.1.1.1.1. Comparación entre animales de distintas edades**

La respuesta motora y el aprendizaje fue evaluado en el TEC (S1-S7) en machos de la cepa Sprague-Dawley entrenados a partir de distinta edad, 20, 30, 40, 60 y 90 días, y las variables Vm y EA, cuantificadas para cada grupo, fueron volcados en la tabla 1.

**TABLA 1**  
**ACTIVIDAD EN EL TEST DE ENTRENAMIENTO CIRCULAR (TEC)**

Edad al entrenamiento	Vm	EA
20	9.9 ± 2.5	61 ± 11#
30	9.2 ± 2.7	33 ± 6
40	9.4 ± 2.1	38 ± 7
60	8.8 ± 1.9	31 ± 5
90	8.6 ± 2.4	35 ± 7

*Los valores de cada grupo representan el promedio ± el desvío estándar. Todos los datos corresponden a animales machos de la cepa Sprague-Dawley. Vm: velocidad motora máxima; EA: errores acumulados. N por grupo: 18. El estudio estadístico por ANOVA demostró que existen diferencias entre los grupos para la variable EA ( $p < 0.001$ ), el estudio a posteriori por el test de comparación múltiple de Tukey-Cramer demostró que el grupo 20 muestra diferencias estadísticas con todos los otros grupos ( $\alpha < p < 0.001$ ). No existen diferencias significativas para Vm ( $p > 0.1$ ).*

El estudio del Vm demuestra que no existen diferencias del comportamiento motor, en cuanto a esta variable, entre los distintos grupos comparados ( $p > 0.1$ ). Sin embargo, aunque no reviste significancia, pudo observarse que la respuesta motora de los animales de 90 días es relativamente menor que la de los otros grupos. Precisamente, la observación directa de la actividad de estos animales durante el TEC permitió comprobar que, debido a su mayor contextura física, los animales de 90 días presentan dificultades para el normal desenvolvimiento en la prueba. Los animales parecían tener problemas de espacio dentro del aparato y también se observó, en forma sistemática, que se paraban sobre sus patas traseras para buscar el pico que vierte la gota en lugar de buscarla en el piso, lo que hizo necesario elevar el techo del equipo de entrenamiento. Claramente, la contextura física de los animales de 90 días es mayor que la de otros grupos y, posiblemente, las dimensiones del aparato de entrenamiento no sean del todo

adecuadas. Por todo esto, los resultados obtenidos para los animales de 90 días se ven afectados por la aparición de nuevas conductas (e.g. búsqueda del origen de la gota) que distorsionan la respuesta al TEC en una manera difícil de evaluar.

**TABLA 2**  
**ACUMULACION DE ERRORES EN EL TEST DE ENTRENAMIENTO**  
**CIRCULAR**

ERRORES PROMEDIO POR SESION

GRUPO (Edad)	Día Destete	NUMERO DE SESION						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
20	19	22	17	11	5	3	1	2
30	21	15	10	5	2	0	1	0
40	21	18	11	6	2	1	0	0
60	21	14	8	5	3	1	0	0
90	21	16	9	6	1	2	0	1

*El número que identifica a cada grupo corresponde a la edad de los animales al inicio del test de entrenamiento circular (20 a 90). Las 7 sesiones consecutivas (I a VII) no incluyen la sesión inicial (S0) que no fue tabulada. N por grupo: 9. Todos los entrenamientos fueron realizados con animales machos de la cepa Sprague-Dawley. Los desvíos estándares no fueron graficados pero en ningún caso superan el 21% de dispersión. El estudio estadístico por ANOVA demostró que existen diferencias entre los grupos para la variable FA ( $p < 0.001$ ), el estudio a posteriori por el test de comparación múltiple de Tukey-Cramer demostró que el grupo 20 muestra diferencias estadísticas con todos los otros grupos ( $p < 0.001$ ).*

Por otra parte, en los mismos grupos fue evaluada el componente de aprendizaje a través de la comparación de los errores acumulados. En este caso, el análisis estadístico permitió comprobar que los animales entrenados a partir de los 20 días de edad presentan una diferencia sustancial respecto a los otros cuatro grupos, los cuales no

muestran diferencias entre sí. Los animales de 20 días muestran un mayor número de errores en el aprendizaje de la consigna ( $p < 0.001$ ). Complementariamente, la tabla 2 permite observar los errores acumulados por sesión para cada grupo experimental. Por un lado puede confirmarse mediante el análisis de los datos la misma diferencia mencionada anteriormente. Por otro, queda claro que el patrón de errores sesión por sesión es similar cualitativamente entre los distintos grupos. Es decir, el número de errores va decreciendo a medida que se acumulan las sesiones. Prácticamente en las últimas tres sesiones no se cometen errores, mientras que en las primeras tres se acumulan la mayor cantidad.

**TABLA 3**  
**EFEECTO DEL DESTETE TEMPRANO EN EL COMPORTAMIENTO**  
**EN EL TEST DE ENTRENAMIENTO CIRCULAR**

Grupo (edad)	Edad al destete	Errores acumulados	Vm
20	19	65 ± 9#	9.8 ± 1.0
30	19	37 ± 8	9.4 ± 1.7
30	21	34 ± 5	9.0 ± 1.5

*El número que identifica a cada grupo corresponde a la edad de los animales al inicio del entrenamiento. Los errores acumulados corresponden a la sumatoria de errores de cada animal durante las 7 sesiones de entrenamiento (S1 a S7), descontando la sesión inicial (S0). Cada dato representa el valor promedio ± el desvío estándar. En todos los casos se entrenaron animales machos de la cepa Sprague-Dawley. N de cada grupo: 7.  $p < 0.001$ .*

Si bien la variación en la Vm puede discutirse en términos de contextura física, el comportamiento diferencial respecto al aprendizaje, claramente puede presentar otras connotaciones. El comportamiento descrito en el caso de los animales de 20 días puede estar relacionado con la mayor inmadurez relativa en este grupo experimental y también con el hecho de que fueron el único grupo destetados en forma más temprana,



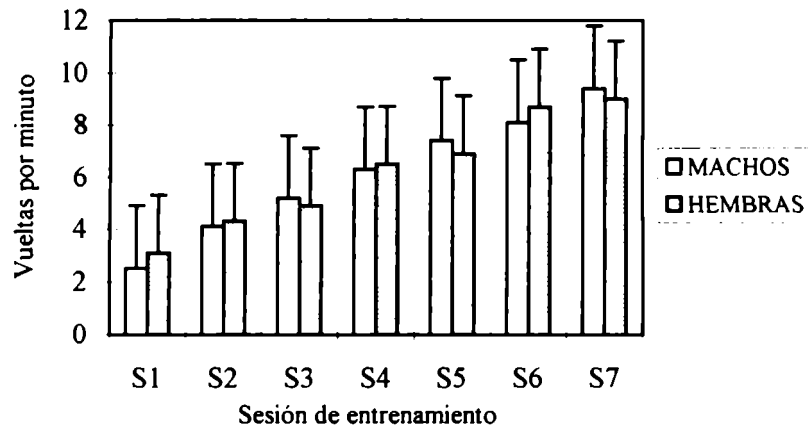
a los 19 días en lugar de a los 21 días, a fin de someterlos a estrés hídrico 24 horas antes de iniciar el entrenamiento a los 20 días de edad. Para evaluar esta posibilidad se realizó un entrenamiento de animales machos de 20 días y otros dos entrenamientos con dos grupos de animales de 30 días de edad, uno destetado a los 19 días y el otro a los 21. La tabla 3 permite observar comparativamente a los EA y el Vm de los tres grupos. Estas variables fueron similares en los dos grupos de animales entrenados a los 30 días de edad, sin importar la edad de destete. Por otra parte, ambos grupos difirieron en relación a los animales de 20 días en cuanto a los EA pero no respecto al Vm.

#### **3.1.1.1.2. Animales entrenados a los 30 días**

Como se verá más adelante, el estudio neuroquímico realizado sobre los distintos grupos nombrados anteriormente, orientó el interés experimental preferentemente hacia los animales entrenados a partir de los 30 días de edad. Por ello, sobre este grupo en particular se realizaron nuevas comparaciones.

##### **3.1.1.1.2.1. Comparación de machos y hembras**

Animales machos y hembras de la cepa Sprague-Dawley de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC (S0-S7). A partir de los datos vertidos en la figura 8 se puede observar por un lado que el comportamiento es similar para ambos sexos. Por el otro, puede analizarse la respuesta de los animales a lo largo de las distintas sesiones. Si bien la Vp fue de  $6.1 \pm 2.4$  vueltas por minuto para los machos y  $6.2 \pm 2.2$  para las hembras, la velocidad de giro en la primera sesión y la última difieren notablemente. Para los machos, la velocidad inicial fue de  $2.5 \pm 1.1$  vueltas por minuto y la Vm  $9.4 \pm 1.6$ , mientras que para las hembras la mismas variables fueron  $3.1 \pm 1.3$  y  $9.0 \pm 1.2$  vueltas por minuto, respectivamente.



**Figura 8. Respuesta motora en el TEC.** Animales de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC durante 7 días consecutivos (S1 a S7). El gráfico muestra la velocidad promedio alcanzada por los mismos en cada sesión. La actividad de machos y hembras fue evaluada en forma independiente ( $n$  de cada grupo: 16).

Evidentemente, a medida que pasan las sesiones la velocidad de giro aumenta. La observación directa durante el TEC permite comprender que, en las primeras sesiones, se consume una mayor cantidad de tiempo en otras actividades que no son las recompensadas, mientras que a medida que pasan las sesiones sucede lo contrario: los animales priorizan el comportamiento recompensado y de esta manera en el mismo período de tiempo la cantidad de giros aumenta. Debe quedar en claro a partir de este análisis que la velocidad de giro en el TEC (número de vueltas por minuto) no necesariamente indica la velocidad real, es decir cuánto tarda el animal en dar una vuelta. En realidad indica, como se puede deducir de su concepto, la cantidad de vueltas que realiza. Por ejemplo, si en 5 minutos el animal corre 5 vueltas a velocidad constante y luego se queda 5 minutos inmóvil, la velocidad real es bimodal al principio fue 1 vuelta por minuto y al final fue nula. Sin embargo el cálculo utilizado indicaría que el animal recorrió 5 vueltas en 10 minutos, o sea que su  $V_m$  sería 0.5. Sin embargo, aunque esta situación puede ser real al principio, la distorsión es mucho menor a medida que pasan las sesiones. Nuevamente, la observación directa permite observar

que el cálculo del Vm utilizando los datos recogidos automáticamente por el sistema de conteo del TEC es un marcador confiable de la respuesta motora real del animal.

#### **3.1.1.1.2.2. Respuesta de machos de distintas cepas**

Para las distintas experiencias sobre animales de 30 días llevadas a cabo a lo largo del presente trabajo se utilizaron, indistintamente, dos cepas distintas: Sprague-Dawley y Wistar. La respuesta comportamental fue similar en ambos casos. Los valores obtenidos para la cepa Sprague-Dawley fueron Vm:  $9.1 \pm 2.9$ , EA:  $32 \pm 9$  y para la cepa Wistar Vm:  $10.4 \pm 2.1$ , EA:  $33 \pm 8$ . Tanto el componente de aprendizaje, como el correspondiente a la actividad motora no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos, aunque si existió una tendencia a favor de una mejor respuesta motora en la cepa Wistar. Esto puede no estar relacionado necesariamente con las características de la cepa sino con las condiciones de crianza y mantenimiento en los distintos bioterios.

#### **3.1.1.1.2.3. Comportamiento circanual**

La tabla 4 muestra los valores de Vm y EA obtenidos con machos Sprague-Dawley en distintos meses del año. El rendimiento en los meses de Diciembre y Febrero fue menor en ambos parámetros conductuales (Vm y EA). También en esos meses se observó una mayor pérdida de peso, mayor descarte e inclusive 2 casos de mortalidad sobre 28 animales entrenados. En ningún otro momento del año se observó mortalidad. Si bien, el sector de entrenamiento cuenta con un ambiente climatizado los meses de diciembre a febrero muestran un aumento de temperatura que puede ser de 4 a 6 °C. El estado hídrico de los animales es crítico con este diseño experimental y la respuesta fisiológica del animal puede ser influenciada por las condiciones de temperatura ambiental. El aumento importante de la temperatura detectada en los meses de verano, de hecho, modifican algunas variables como las descritas anteriormente. Por ello, a partir de estos resultados, los entrenamientos realizados con el objeto de evaluar cambios neuroquímicos sólo fueron realizados entre los meses de marzo y noviembre.

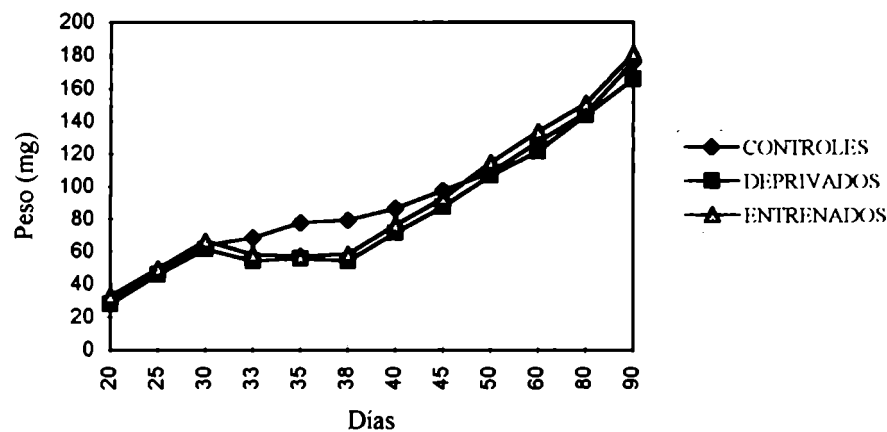
**TABLA 4**  
**COMPORTAMIENTO CIRCANUAL EN EL TEST DE ENTRENAMIENTO**  
**CIRCULAR**

Mes	ANIMALES ENTRENADOS A LOS 30 DIAS DE EDAD											
	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Entren												
<b>Vm</b>	7.8	7.4	10.0	10.3	9.5	9.1	10.6	10.4	9.0	9.1	8.9	8.3
<b>EA</b>	36	41	28	27	33	29	34	26	38	40	33	39
N anim	22	24	32	36	45	38	40	42	20	24	30	18
N años	3	3	4	5	5	5	4	5	5	4	4	3

*Fueron tabulados los valores promedio de Vm (velocidad máxima) y EA (errores acumulados), no se indica el desvío estándar pero en ningún caso fue mayor de : 25%; N anim, representa el número de animales entrenados a partir de los cuales se obtuvo los valores indicados más arriba. N años, representa el número diferente de años en los cuales se realizaron entrenamientos con estas características. En todos los casos los datos representan valores de animales machos de la cepa Sprague-Dawley y Wistar.*

#### 3.1.1.1.2.4. Evolución del peso de los animales

Los animales son deprivados de agua durante los 8 días que dura el test y la única ingesta de agua que obtienen es durante la sesión de entrenamiento. Para evaluar el efecto de la deprivación hídrica en el desarrollo físico de los animales se estudió la evolución del peso de los animales a partir de los 14 días de edad hasta los 80 días de edad. La figura 9 muestra la evolución del peso de animales machos deprivados a partir del día 29 y entrenados del día 30 al 37. La respuesta obtenida fue similar para otros grupos experimentales salvando la distancia de que la caída del peso se produce en distintos períodos, en el período de entrenamiento particular de cada grupo. Los animales entrenados y controles deprivados fueron comparados con animales que no fueron ni entrenados ni deprivados. El peso corporal decreció aproximadamente un 12% durante el período de entrenamiento respecto al peso inicial del animal sin encontrarse diferencia entre los animales deprivados controles y entrenados.



**Figura 9. Evolución del peso de los animales.** El peso de los animales fue controlado desde el destete hasta los 90 días de edad, excepto en aquellos que fueron sacrificados antes de esa fecha. Fuera del periodo de entrenamiento, todos los animales dispusieron de agua y comida ad libitum. Durante la duración de los tests, todos fueron sometidos a estrés hídrico, restringiéndoles la ingesta de agua pero no de comida. El gráfico muestra los resultados de un experimento de entrenamiento de animales de 30 días. La evolución del peso de los animales entrenados y controles, ambos privados de agua, se compara con la curva de un grupo de animales controles sin privación. (n de cada grupo: 12).

Al final del período de entrenamiento, el peso corporal de los animales privados era aproximadamente un 30% inferior al de los controles no privados. Sin embargo en menos de 12 días de finalizado el TEC, los animales entrenados y controles privados recuperaron el peso esperado para su edad y no se observaron diferencias respecto del desarrollo físico entre animales entrenados y no entrenados a partir dicho momento. Resultados similares fueron obtenidos con animales hembras entrenados a partir del día 30 de edad. Por otra parte, la pérdida de peso fue menor y la recuperación más rápida cuanto más grande era el animal al inicio del entrenamiento (tabla 5), aunque dichas diferencias no fueron significativas. Del mismo modo, la cantidad de animales excluidos debido a la caída del peso fue inversamente proporcional a la edad de los grupos experimentales.

**TABLA 5**  
**EVOLUCION DEL PESO DE LOS ANIMALES DURANTE Y DESPUES**  
**DE REALIZAR EL TEST DE ENTRENAMIENTO CIRCULAR**

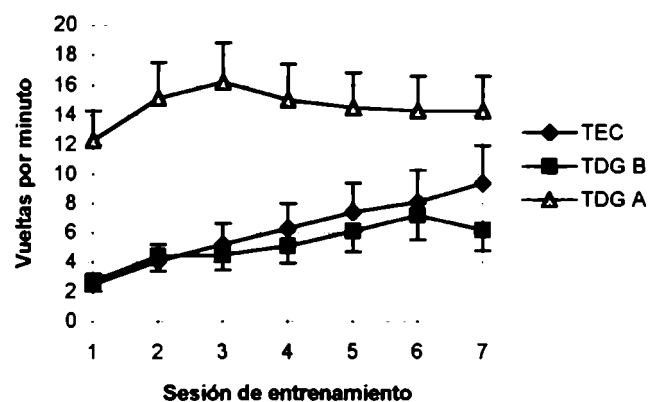
	Edad de entrenamiento				
	20	30	40	60	90
% variación					
(CT)	13.1±1.3	11.9±1.6	13.3±2.4	10.4±2.2	9.4±1.3
(ENT)	12.8±1.9	12.1±1.4	12.3±1.7	11.3±1.5	9.8±1.2
días recuperación postentrenamiento	18±8	11±2	9±3	8±3	6±2

*Los grupos 20, 30, 40, 60 y 90 indican la edad de los animales al inicio del entrenamiento. % de variación respecto al inicio, indica el % de caída del peso de los animales desde el primer día de entrenamiento (S0) al último (S7); CT: animales controles, privados de agua pero no entrenados; ENT: animales privados de agua y entrenados. Días de recuperación postentrenamiento, indica el número de días con agua y comida ad libitum que necesitaron los animales, tanto los controles como los entrenados, para alcanzar los estándares de peso de animales de su misma edad que nunca fueron privados.*

### 3.1.2. Comportamiento en el Test del Disco Giratorio

Los experimentos con machos de 30 días de edad en el TDG muestran que su colocación en la plataforma en movimiento induce a los animales a correr en el sentido contrario de giro. Este comportamiento espontáneo no fue observado en el 21% de los casos (1 de cada 5 animales), los que fueron descartados del entrenamiento. La actividad motora desarrollada en el TDG presenta características particulares que permiten una evaluación propia y una comparación con la respuesta motora observada en el TEC. La figura 10 muestra los Vps obtenidas para cada sesión obtenidos con animales entrenados a los 30 días de edad. Una característica del entrenamiento en el TDG es que los animales corren a una velocidad regular todo el tiempo y mantienen, así, prácticamente la misma velocidad de giro a lo largo de todas las sesiones. De acuerdo a los valores de entrenamiento, los animales fueron divididos en dos grupos: los que corrieron con una Vp mayor de 10 vueltas por minuto (grupo A) y lo que lo

hicieron por debajo (grupo B). En promedio, el primer grupo mostró una velocidad de giro de  $14.4 \pm 2.3$  vueltas por minuto y el grupo B de  $6.9 \pm 1.8$  vueltas por minuto. Observando la curva del TDG A, puede notarse que, en promedio, los animales presentan un moderado aumento de la velocidad en las primeras sesiones, que indicaba un ritmo parejo. Esto no invalida la afirmación anterior. Una posible causa para esta observación es que en las últimas 4 sesiones cada animal debe girar 150 veces en vez de 100 como hacía en las sesiones anteriores. Este aumento de la actividad puede producir, presumiblemente por fatiga, una reducción en la velocidad en la última parte del entrenamiento. Más allá de esta observación, en general, los animales en el TDG muestran una actividad motora constante a lo largo de toda la sesión y la magnitud de la respuesta motora es similar también durante los 7 días de entrenamiento.



**Figura 10.** Actividad motora de los animales en el TEC y el TDG. Animales machos de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC y el TDG durante 7 días consecutivos. El gráfico muestra la velocidad promedio alcanzada por los mismos en cada sesión. Los animales entrenados en el TDG fueron subdivididos en 2 grupos, A y B, según hayan superado o no una velocidad promedio de 10 vueltas por minuto, respectivamente.

La comparación entre el TEC y el TDG permite comprobar que la curva TDG B es similar a la curva obtenida en el TEC, mientras que las dos difieren de la curva TDG A. Del mismo modo, la velocidad de giro en la última sesión del TEC ( $8.8 \pm 1.6$ ) es similar a la calculada para el TDG B ( $p > 0.1$ ) y difiere de la del TDG A ( $p < 0.001$ ). La

comparación de las curva también permite observar que, a diferencia de lo que sucede en el TDG A y TDG B, donde la respuesta motora es constante, en el TEC la velocidad de giro aumenta sesión a sesión y esto está relacionado con el factor de aprendizaje y motivacional presente en este último y ausente en el primero. En el TDG B las últimas sesiones muestran un aumento moderado de la velocidad. Considerando que la respuesta inicial en este grupo fue baja, esto puede deberse a una mejor adaptación a la actividad.

**TABLA 6**  
**PESO DE LAS ESTRUCTURAS NERVIOSAS DISECADAS**  
**EN ANIMALES ENTRENADOS A LOS 30 DIAS DE EDAD**

	CONTROLES	ENTRENADOS
	mg húmedo de tejido	
Cuerpo estriado (izquierdo)	41.2 ± 4.4	42.6 ± 3.8
Cuerpo estriado (derecho)	40.6 ± 4.0	39.8 ± 4.2
Corteza frontal	70.3 ± 12.1	73.5 ± 11.5
Corteza motora	32.5 ± 5.1	29.8 ± 3.7
Corteza occipital	83.7 ± 16.5	91.3 ± 13.4
Amígdala	17.8 ± 6.6	21.5 ± 7.3
Hipocampo	29.5 ± 5.3	27.1 ± 6.7
Cerebelo	68.5 ± 9.5	71.4 ± 5.5

*Los valores obtenidos para cada estructura representan el promedio ± desvío estandar de 7 mediciones, excepto para corteza motora n = 24 y cuerpo estriado n = 42. Todos los animales son machos de la cepa Sprague-Dawley o Wistar sacrificados a los 90 días de edad.*



### 3.2. CONDICIONES DEL TEJIDO PARA ESTUDIOS NEUROQUIMICOS

#### 3.2.1. Disección y fraccionamiento subcelular

##### 3.2.1.1. Determinación del peso y concentración de proteínas

Luego del entrenamiento según el esquema indicado para cada experimento, los animales fueron sacrificados, los cerebros removidos y disecadas las distintas áreas de interés. Para cada estructura fue determinado el peso y la concentración de proteínas. La tabla 6 muestra los pesos de las distintas estructuras de animales entrenados a los 30 días de edad y de sus controles respectivos.

**TABLA 7**  
**CONCENTRACION DE PROTEINAS EN**  
**LAS ESTRUCTURAS NERVIOSAS DISECADAS**

	CONTROLES	ENTRENADOS
	µg proteínas/mg tejido	
Cuerpo estriado (izquierdo)	60.5 ± 12.3	58.2 ± 11.3
Cuerpo estriado (derecho)	61.3 ± 10.5	59.6 ± 9.5
Corteza frontal	80.6 ± 13.3	76.5 ± 10.1
Corteza motora	61.8 ± 11.9	65.0 ± 13.8
Corteza occipital	66.4 ± 12.2	63.1 ± 14.0
Amígdala	62.3 ± 9.8	59.4 ± 7.9
Hipocampo	57.1 ± 8.8	59.6 ± 10.3
Cerebelo	64.5 ± 11.1	60.4 ± 9.7

*Los valores obtenidos para cada estructura corresponden a la cuantificación de µg de proteínas por mg de tejido en la fracción subcelular correspondiente a mitocondrias. Cada valor representa el promedio más el desvío estandar de 7 mediciones, excepto para corteza motora n = 24 y cuerpo estriado n = 42. Todos los datos fueron obtenidos de animales machos de la cepa Sprague-Dawley o Wistar sacrificados a los 90 días de edad.*

La tabla 7 muestra la concentración de proteínas de los distintos grupos en la fracciones de sinaptosomas, sobre la cual se realizaron la mayoría de las mediciones neuroquímicas. El análisis comparativo no muestra diferencias en el peso ni en la concentración de proteínas entre los animales controles y entrenados para ninguno de las estructuras nerviosas evaluadas. Un análisis similar entre distintos grupos experimentales (e.g. machos vs hembras, Sprague-Dawley vs Wistar, entrenados a los 20 vs entrenados a los 30), no mostró diferencias en ninguna de estas variables.

### **3.2.1.2. Medición de AchE y unión de $^3\text{H}$ -QNB en fracciones subcelulares**

Como se indica en la sección de materiales y métodos, se realizaron, principalmente, dos esquemas de fraccionamiento para obtener membranas de los sinaptosomas. En un caso se trabajó con la membrana sinaptosomal de la fracción sinaptosomas y en una segunda estrategia se obtuvo membrana sináptica purificada a partir de un gradiente de sacarosa. En ambos casos, se determinaron los niveles de AchE y de unión de  $^3\text{H}$ -QNB comparando las fracciones provenientes de animales entrenados con sus respectivos controles. La AchE es una proteína de membrana sináptica que interviene en la transmisión colinérgica y sirve como marcador de fracción sináptica, aunque también puede presentar otras ubicaciones subcelulares (e.g. microsomas). La tabla 8 muestra los niveles detectados de AchE en distintas fracciones subcelulares en cuerpo estriado de animales entrenados a los 30 días de edad y controles. La fracción denominada sinaptosomas corresponde a la fracción mitocondrial. El estudio comparativo no permite observar diferencias en el patrón de distribución de la enzima, como tampoco permite observar que el entrenamiento por sí mismo modifique la distribución de la unión del  $^3\text{H}$ -QNB a las distintas fracciones. Esta distribución resultó similar para otros tejidos y otros grupos experimentales. Por otra parte permite corroborar el grado de enriquecimiento en terminales colinérgicos de cada fracción. Se observa que tanto la fracción sinaptosomas como la de membrana sináptica 1M presentan una mayor concentración específica de membrana sináptica.

**TABLA 8**  
**DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE ACHE Y DE LA UNION DE <sup>3</sup>H-QNB AL**  
**mACHR EN FRACCIONES SUBCELULARES**

	Proteínas µg/mg tej		AChE*		QNB*	
	CT	ENT	CT	ENT	CT	ENT
Hto/PT	135.5±31.5	128.6±28.5	1.00		1.00	
Nu	23.0±2.6	25.4±3.5	1.16±0.46	1.09±0.08	1.90±0.36	1.74±0.41
Mit	58.4±11.2	60.5±10.1	0.94±0.09	1.11±0.08	1.43±0.62	1.58±0.43
Mic	39.8±6.0	34.3±8.8	1.74±0.58	1.89±0.49	1.98±0.45	1.87±0.41
MS1M	2.3±0.4	2.1±0.8	4.40±1.03	4.15±0.94	6.88±1.78	6.45±1.23

*La distribución de la actividad de acetilcolinesterasa y del binding de QNB fue realizado sobre animales controles no entrenados de 90 días de edad y animales entrenados a los 30 días de edad y sacrificados a la misma edad que los controles. \*AChE y \*QNB: representan la actividad específica relativa de la enzima y la unión específica relativa del ligando evaluados como se describe en materiales y métodos. Hto/PT: Homogenato Pellet total; Nu: Fracción nuclear; Mit: Fracción mitocondrial; Mic: Fracción microsomal y MS1M: Fracción de membrana sináptica 1M obtenida por gradientes de sacarosa.*

### 3.3. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LOS PARAMETROS NEUROQUIMICOS

#### 3.3.1. Estudios de los efectos a largo plazo sobre el mAChR

El mAChR representa el parámetro neuroquímico central de evaluación en este trabajo. La determinación del número de receptores y de su afinidad fue realizada bajo distintas condiciones experimentales. En todos los casos en esta sección, los animales fueron sacrificados luego de varias semanas (al menos dos) de finalizado el entrenamiento. De esta manera, los estudios neuroquímicos consecuentes priorizan la detección de los posibles cambios estables producidos luego del entrenamiento en lugar de los cambios transitorios involucrados con la respuesta inmediata a la actividad fisiológica. Salvo que

se indique lo contrario, la determinación del mAChR se realizó sobre la fracción de sinaptomasas.

**TABLA 9**  
**EFFECTO DEL TEST DE ENTRENAMIENTO CIRCULAR**  
**EN LOS NIVELES DE RECEPTOR COLINERGICO MUSCARINICO**

EA (edad)	mAChR (fmoles/mg prot)			
	Machos		Hembras	
	ENT	CT	ENT	CT
20	751±94	712±107	802±156	786±133
30	462±52*	688±99	560±66#	736±102
40	809±109	715±101	753±128	741±117
60	836±96	775±103	881±180	822±166
90	766±109	739±98	805±159	830±106

*EA: edad de inicio del entrenamiento en el TEC. Todos los animales fueron sacrificados a los 90 días de edad, excepto los EA90 y sus controles que fueron sacrificados a los 120 días de edad. ENT: entrenados; CT: controles. N de cada medición: 6, excepto EA20 (n 14), EA30 (n 18) y EA60 (n 12). Diferencia estadística respecto al control: \*p< 0.001, #p< 0.005.*

### 3.3.1.1. Efecto del TEC sobre el mAChR del Cuerpo Estriado

#### 3.3.1.1.1. Efecto del TEC a distintas edades

En estos experimentos, machos y hembras de la cepa Sprague-Dawley de 20, 30, 40, 60 y 90 días de edad fueron entrenados en el TEC (S0-S7) y sacrificados a los 90 días de edad, excepto los del último grupo experimental que, entrenados a partir de los 90 fueron sacrificados a los 120 días. La tabla 9 muestra los valores de B<sub>máx</sub> del mAChR obtenidos por ensayos de unión del ligando específico a saturación, para machos y hembras entrenados a las distintas edades. Dado que los valores fueron similares entre el cuerpo estriado derecho y el izquierdo, los datos tabulados representan el promedio del valor obtenido para cada estructura. El análisis de estos resultados demuestra que

sólo los animales entrenados a partir de los 30 días de edad muestran una disminución en la densidad del mAChR, mientras que el resto de los grupos experimentales no presentan diferencias con su control respectivo. La variación encontrada representa una caída del  $33 \pm 4 \%$  en los animales machos ( $p < 0.001$ ) y de  $24 \pm 7 \%$  en las hembras ( $p < 0.005$ ). Las curvas de Scatchard para los animales de 30 días no muestran diferencias de afinidad entre los distintos grupos experimentales (machos controles:  $0.72 \pm 0.08$  nM, machos entrenados  $0.66 \pm 0.12$ , hembras controles:  $0.69 \pm 0.11$ , hembras entrenadas:  $0.66 \pm 0.10$ ;  $p > 0.1$ , n: 4). Estos experimentos permiten comprobar que sólo los animales que comienzan su entrenamiento a partir de los 30 días de edad presentan una alteración en la densidad del mAChR, el resto de los grupos no presentan diferencias en el Bmax comparadas con el control, mientras que la afinidad se mantiene inalterada en todos los grupos.

**TABLA 10**  
**EFFECTO DEL TEST DE ENTRENAMIENTO CIRCULAR SOBRE EL RECEPTOR**  
**COLINERGICO MUSCARINICO. EVALUACION DE LATERALIDAD Y**  
**SENTIDO DE GIRO**

		CONTROLES	ENTRENADOS
CED SGH	B <sub>máx</sub> (fmoles/mg prot)	702 ± 99	455 ± 49 #
	K <sub>d</sub> (nM)	0.67 ± 0.12	0.71 ± 0.16
CEI SGH	B <sub>máx</sub> (fmoles/mg prot)	695 ± 85	472 ± 57 #
	K <sub>d</sub> (nM)	0.69 ± 0.09	0.66 ± 0.11
CED SGA	B <sub>máx</sub> (fmoles/mg prot)	675 ± 75	432 ± 68 #
	K <sub>d</sub> (nM)	0.63 ± 0.10	0.69 ± 0.11
CEI SGA	B <sub>máx</sub> (fmoles/mg prot)	683 ± 72	477 ± 48 #
	K <sub>d</sub> (nM)	0.73 ± 0.14	0.72 ± 0.09

*Animales machos de la cepa Sprague-Dawley entrenados a los 30 días de edad y sacrificados a los 90 días. n de cada valor = 6. La determinación de B<sub>máx</sub> y K<sub>d</sub> se realizó por el método de unión de ligando y posterior separación por filtración. CED: cuerpo estriado derecho; CEI: cuerpo estriado izquierdo; SGH: sentido de giro horario; SGA: sentido de giro antihorario. #: Diferencia estadística respecto a su control,  $p < 0.001$ , n: 7.*

#### **3.3.1.1.2. La caída del mAChR es independiente del sentido de giro**

Un grupo de animales machos de la cepa Sprague-Dawley de 30 días de edad fue entrenado en el TEC (S0-S7) en sentido horario y otro en sentido antihorario. Luego fueron sacrificados a los 90 días de edad junto con los controles correspondientes. El cuerpo estriado derecho e izquierdo fueron removidos y estudiados por separado en cada animal. La tabla 10 muestra los valores de Bmax y Kd promedio obtenidos en cada grupo. La caída observada en el Bmáx es similar en ambos lados del cuerpo estriado y es independiente del sentido de giro ya que se produce tanto con el entrenamiento en sentido horario como en el realizado en sentido antihorario ( $p>0.1$ ). La afinidad del receptor es la misma en todos los grupos experimentales ( $p>0.1$ ).

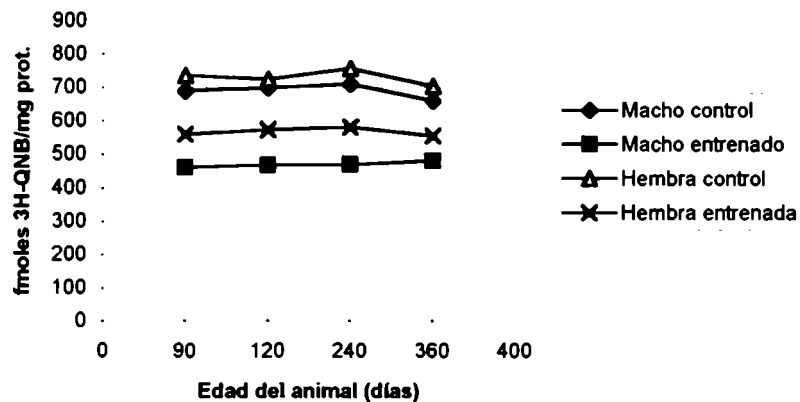
#### **3.3.1.1.3. La reducción es similar en ambas cepas animales**

En otros experimentos fueron entrenados machos de 30 días en el TEC (S0-S7) tanto de la cepa Sprague-Dawley como Wistar. Sacrificados a los 90 días de edad, se determinó el Bmax para mAChR en cuerpo estriado. La cuantificación del receptor en animales controles de ambas cepas mostró los mismos niveles de Bmax (Controles: Sprague-Dawley  $712 \pm 87$  fmoles/mg proteína, Wistar  $689 \pm 98$ ; Entrenados: Sprague-Dawley  $477 \pm 95$  fmoles/mg proteínas; Wistar:  $455 \pm 68$ ,  $p>0.1$ , n: 7), La caída, respecto a sus respectivos controles fue de  $33 \pm 4\%$  para la cepa Sprague-Dawley y  $34 \pm 3\%$  para la cepa Wistar.

#### **3.3.1.1.4. Los cambios del mAChR son permanentes**

Luego del entrenamiento de machos de 30 días en el TEC (S0-S7), los animales fueron divididos en grupos y sacrificados a distintos tiempos postentrenamiento para determinar de esta manera la duración de los cambios detectados precedentemente. El primer grupo fue sacrificado a los 15 días de terminado el entrenamiento y el último un año después de completada la última sesión. La figura 11 muestra que la caída del Bmax del mAChR se mantiene en forma similar y constante luego de un año de

finalizado el entrenamiento. Dada la expectativa de vida de las ratas y considerando que el tiempo post-entrenamiento es proporcionalmente mucho mayor que el período que dura la actividad en el TEC, estos resultados comprueban que la caída del mAChR se mantiene en forma permanente en el cuerpo estriado luego del entrenamiento a los 30 días de edad.

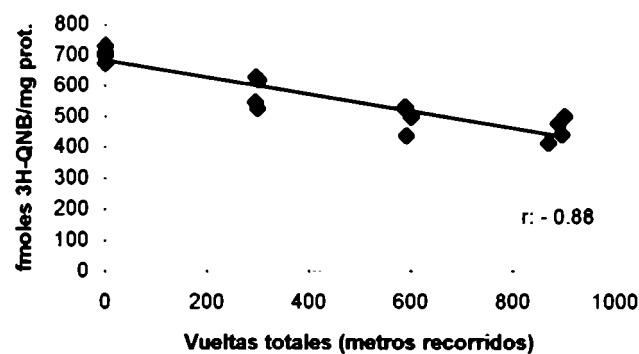


**Figura 11. Duración de los cambios en el mAChR luego del TEC.** Animales machos y hembras de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC durante 7 sesiones consecutivas. Distintos grupos de animales fueron sacrificados a diferentes edades postentrenamiento, entre los 90 y 360 días de edad. *n* de cada punto: 12. La diferencia entre los grupos controles y entrenados fue significativa en todos los casos ( $p < 0.001$ ).

### 3.3.1.1.5. La caída del mAChR depende de la actividad realizada

Animales machos y hembras de la cepa Sprague-Dawley fueron entrenados en el TEC con distintos esquemas de trabajo. Descontándose la S0 que se realizó en todos los casos, un primer grupo fue entrenado durante 3 sesiones (S1-S3), lo que representó un total de aproximadamente 300 vueltas. Otro grupo entrenó 5 sesiones (S1-S5), con un total de aproximadamente 600 vueltas. El último grupo fue entrenado por el total de sesiones (S1-S7), que equivale a 900 vueltas. De este modo, cada grupo experimental realizó una actividad motora diferente (distinta cantidad de metros recorridos). Luego del entrenamiento los animales fueron sacrificados a los 90 días de edad. La figura 12 y 13 permiten observar la variación del Bmax del mAChR en relación al número de

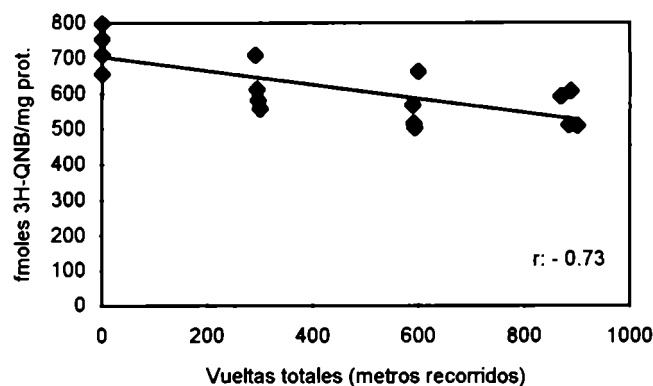
vueltas totales realizadas en el TEC o, lo que es lo mismo, en función de la distancia recorrida (1 vuelta = 1 metro), para machos y hembras, respectivamente. Los niveles del mAChR fueron determinados y comparados con un grupo control. La evaluación de los datos correspondientes a los animales machos muestra una correlación entre las dos variables ( $r: -0.88$ ,  $p < 0.001$ ,  $n: 16$ ). La caída del mAChR es de 19, 28 y 35% luego de 3, 5 y 7 días de entrenamiento, respectivamente..



**Figura 12. TEC en machos de 30 días: Relación mAChR/metros recorridos.** Animales machos de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC durante distinto número de sesiones (3 a 7). De esta manera realizaron una actividad motora diferencial. La caída en la expresión del mAChR fue graficada en función de los metros recorridos por cada animal durante el entrenamiento. Los datos representan el análisis de 16 animales.

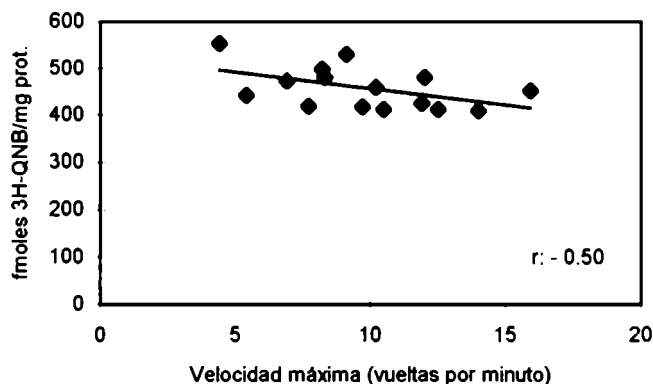
El mismo análisis realizado luego del entrenamiento de animales hembras también muestra una correlación significativa ( $r: -0.73$ ,  $p < 0.002$ ,  $n: 16$ ), donde el entrenamiento de 3, 5 y 7 días representa una caída respectiva de 21, 23 y 24%. En ambos casos, la caída observada para el mAChR es proporcional a la distancia recorrida en el TEC, indicando una relación inversa entre los metros recorridos y los niveles de mAChR postentrenamiento





**Figura 13. TEC en hembras de 30 días: Relación mAChR/metros recorridos.** Animales hembras de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC durante distinto número de sesiones (3 a 7). De esta manera realizaron una actividad motora diferencial. La caída en la expresión del mAChR fue graficada en función de los metros recorridos por cada animal durante el entrenamiento. Los datos representan el análisis de 16 animales.

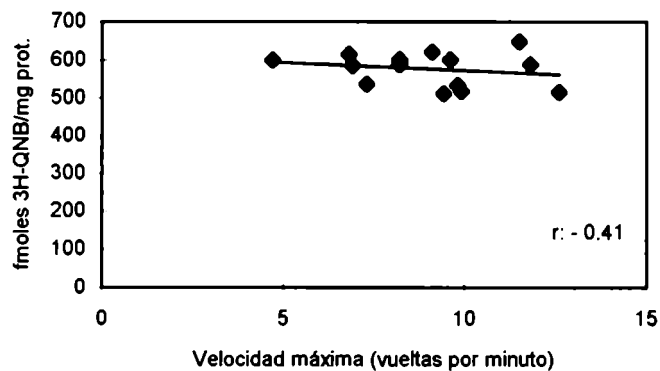
### 3.3.1.1.6. Baja correlación con la velocidad de giro



**Figura 14. TEC en machos de 30 días: Relación mAChR/intensidad de giro.** Animales machos de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC durante 7 sesiones. Los valores máximos de giro para cada animal fueron graficados contra su respectivo nivel de expresión de mAChR. n: 15.

La evaluación de animales que realizaron 7 sesiones en el TEC permite otras comparaciones. Aún cuando todos los animales recorren aproximadamente 900 vueltas luego de 7 días de entrenamiento, cada uno presenta una velocidad de giro promedio

particular dentro del entrenamiento. Para cada animal puede obtenerse un valor individual de Vm que representa la intensidad de giro, de respuesta motora, alcanzada por dicho individuo durante la prueba. Aunque la distancia recorrida en el TEC es exactamente la misma, el tiempo para lograr dicho objetivo y la actividad motora realizada no lo es. La comparación para cada animal del Vm con los valores correspondientes de mAChR permite evaluar si existe una correlación entre la intensidad de giro y la caída del receptor. La figura 14 y 15 muestran que estas dos variables muestran una baja correlación machos y hembras, respectivamente (machos  $r: -0.50, p>0.05, n: 15$ ; hembras  $r: -0.41, p>0.1, n: 14$ ).

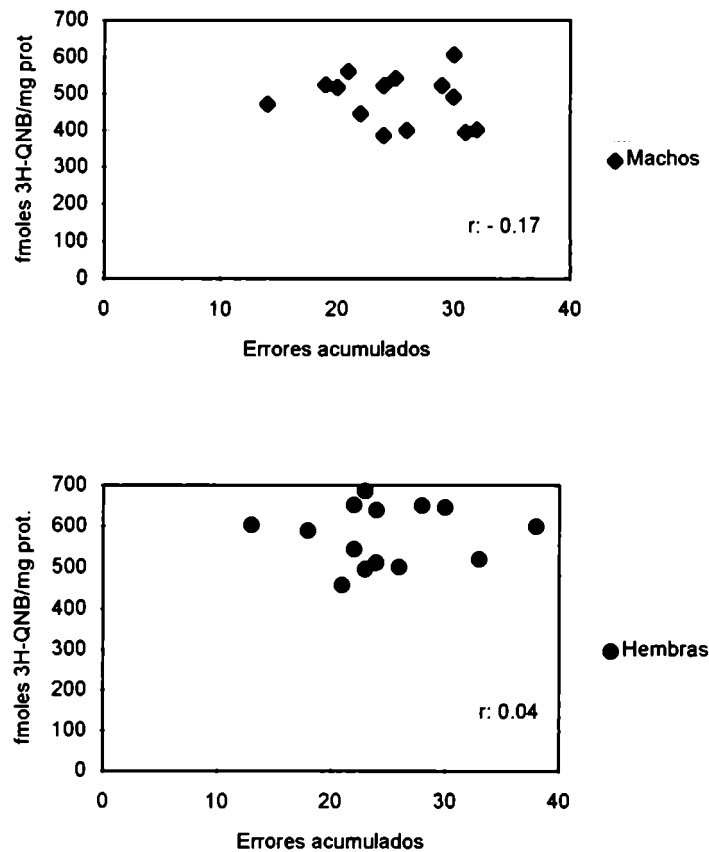


**Figura 15. TEC en hembras de 30 días: Relación mAChR/intensidad de giro.** Animales hembras de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC durante 7 sesiones. Los valores máximos de giro para cada animal fueron graficados contra su respectivo nivel de expresión de mAChR.  $n: 15$ .

### 3.3.1.1.7. La alteración es independiente del aprendizaje asociativo

El mismo grupo experimental evaluado anteriormente fue utilizado para analizar la relación entre la caída del mAChR y el aprendizaje asociativo. Para ello se graficó los valores de caída del mAChR para cada animal con respecto al número de errores acumulados en las primeras 3 sesiones (S1 a S3), descontando la sesión S0 (figura 16). El cálculo fue realizado en forma independiente para los machos y hembras. En ambos

casos, se observa que la caída del mAChR no está asociado número de errores acumulados (machos  $r: -0.171$ , hembras  $r: 0.04$  para hembras,  $n: 14$ ,  $p > 0.1$ ).



**Figura 16. TEC en animales de 30 días: Relación mAChR/errores acumulados.** Animales machos y hembras de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC y evaluados en forma independiente. Luego completar las sesiones S1 a S3, se registraron los errores acumulados durante dicho entrenamiento. Estos datos fueron graficados contra los valores de mAChR de cada animal. Los resultados no muestran una correlación estadísticamente significativa ( $p > 0.1$ ,  $n: 14$ ).

### 3.3.1.1.8. Los cambios son similares en distintas subfracciones

La determinación del Bmax del mAChR en animales machos entrenados a los 30 días de edad y sacrificados a los 90 días fue realizada sobre distintas subfracciones del tejido. La tabla 11 muestra los valores de Bmax obtenidos. La determinación del mAChR en las distintas fracciones (nuclear, mitocondrial, microsomal, citosol) muestra que la mayor población del receptor se encuentra efectivamente en la fracción mitocondrial

(sinaptosomas) y que la cantidad de dicha molécula en el citosol es despreciable. En la fracción nuclear la caída también existe, pero debido a la gran cantidad de proteína espúrea, se observa una mayor dispersión de los valores y mayor fondo en el conteo radioactivo, por lo que dicha fracción luego de ser adecuadamente lavada es descartada.

**TABLA 11**  
**DETERMINACION DEL mAChR EN DISTINTAS SUBFRACCIONES**

	CT (nmol/mg prot)	ENT (nmol/mg prot)	%
Nu	0.91±0.21	0.72±0.17 *	-20.9±6.3
Mit	0.71±0.09	0.46±0.05 #	-35.3±3.2
Mic	0.53±0.08	0.37±0.06 **	-30.2±4.8
Cit	0.06±0.03	0.04±0.02	-----
MS1M	2.41±0.30	1.37±0.22 #	1.44.8±5.2

*Cada valor representa el promedio  $\pm$  desvío estándar del B<sub>máx</sub> del mAChR determinado en 8 animales machos distintos de la cepa Wistar. CT: controles no entrenados, ENT: animales entrenados, %: porcentaje de caída de los niveles de mAChR del grupo entrenado en relación al control respectivo. Nu: Fracción nuclear; Mit: Fracción mitocondrial; Mic: Fracción microsomal y MS1M: Fracción de membrana sináptica 1M obtenida por gradientes de sacarosa. Diferencias estadística significativa (\*)  $p < 0.1$ , (\*\*)  $p < 0.005$ , (#)  $p < 0.001$ ; n: 7.*

En microsomas, si bien existe una proporción importante, la respuesta al entrenamiento es similar lo que indica que no se trata de una subpoblación de sinaptosomas con respuesta diferencial al entrenamiento sino que sólo se diferencian por su menor tamaño. De este modo la fracción mitocondrial es representativa de los cambios observados.

En ninguno de los casos se puede observar que la caída de los niveles de mAChR observados en la fracción mitocondrial, se corresponda con un aumento de dicha

marcador en otra fracción. Evaluando todas las fracciones en conjunto, al igual que independientemente, queda claro que la disminución se debe a una reducción del número.

Por otra parte, la evaluación en la fracción de membrana sináptica 1M en otro esquema de fraccionamiento muestra un mayor porcentaje de caída en el mAChR ( $44.8 \pm 5\%$  vs  $35.3 \pm 3\%$ ). Esta diferencia puede adjudicarse a la mayor concentración de membrana sináptica en esta fracción que en la fracción mitocondrial. La actividad específica de la AchE y del mAChR en las fracciones controles así lo demuestra. De esta manera, al tener una mayor proporción de receptores, la caída se hace más evidente.

### **3.3.1.2. Efectos del TDG sobre el mAChR**

La evaluación del mAChR luego del TDG aporta nueva información a la suministrada por el TEC. En primer lugar el TDG carece de un componente de aprendizaje asociativo, de manera que por comparación de ambos entrenamientos se puede evaluar evaluar si el aprendizaje asociativo es determinante o no de los cambios neuroquímicos observados en el TEC. Por otra parte, la actividad motora rotatoria guarda alta similitud con la observada en el TEC aunque ciertos conceptos deben ser tenidos en cuenta. La actividad motora puede alcanzar mayores valores de velocidad en el TDG a juzgar por el registro de la respuesta de los animales en este test. Por otra parte, de la observación directa del entrenamiento, queda claro que la actividad motora no es exactamente igual. En el TDG los animales corren a una velocidad constante a lo largo de toda la sesión. Por el contrario, en el TEC los animales corren rápidamente hasta donde cae la gota y pasan gran parte del tiempo correspondiente a cada vuelta tomando la recompensa, para luego volver a correr aceleradamente hasta posicionarse nuevamente en el mismo lugar. Con el objeto de comparar ambos entrenamientos, en esta sección se realizaron experimentos con el TDG intentando mantener la mayor similitud posible con los esquemas implementados con el TEC.

### 3.3.1.2.1. Reducción de los niveles de mAChR luego del TDG

Machos de la cepa Wistar fueron entrenados en el TDG durante 7 días, girando en cada sesión el mismo número de vueltas que las realizadas por otro grupo de animales en el TEC, los empleados en el ítem 3.3.1.1.3. El mismo grupo fue utilizado para comparar las variaciones, además de la evaluación comparativa con un grupo control no entrenado (tabla 12). Los animales fueron sacrificados a los 90 días de edad y el B<sub>max</sub> del mAChR fue determinado en cuerpo estriado derecho e izquierdo en los animales entrenados en el TDG. Los resultados de esta determinación demuestran que la actividad motora circular en el TDG produce una caída significativa del número de receptores con respecto a los animales no entrenados ( $43 \pm 4\%$ ,  $p < 0.001$ ), que este cambio es similar en ambos lados del cuerpo estriado y comparable, aunque un poco mayor que la caída producida luego del entrenamiento en el TEC. Por otra parte, como sucede en el TEC, la afinidad del receptor no se modifica con el entrenamiento en el TDG.

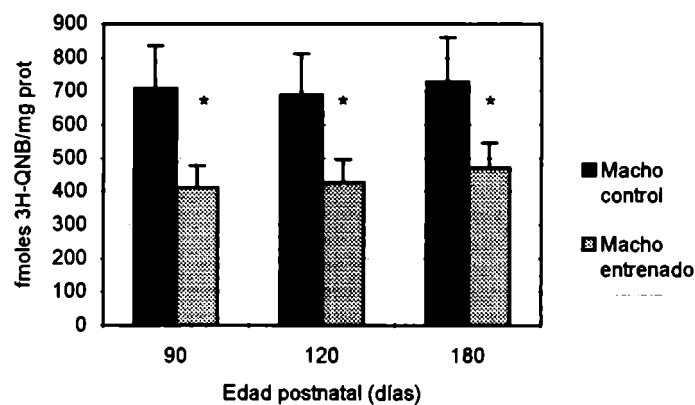
**TABLA 12**  
**EFFECTO DE TEST DEL DISCO GIRATORIO SOBRE EL mAChR EN**  
**ANIMALES DE 30 DIAS**

	CT	ENT TEC	ENT TDG
K <sub>d</sub> (nM)	0.72±0.06	0.68±0.08	0.67±0.09
B <sub>máx</sub> (fmoles/mg prot)	704±87	457±63 #	401±57 #

*Los valores de B<sub>máx</sub> y K<sub>d</sub> del mAChR fue determinado utilizando 3H-QNB en animales controles (CT) y entrenados de acuerdo al test de entrenamiento circular (TEC) o el test del disco giratorio (TDG). En todos los casos se utilizaron machos de la cepa Wistar que fueron entrenados durante 7 sesiones a partir de los 30 días de edad. :: Diferencia estadística respecto al control,  $p < 0.001$ ,  $n = 11$ .*

### 3.3.1.2.2. Los cambios también son a largo plazo

En forma similar a los experimentos realizados con el TEC, diferentes grupos de animales fueron entrenados en el TDG y mantenidos antes del sacrificio por distintos períodos de tiempo. La determinación del Bmax (figura 17) muestra que la caída del receptor luego del TDG se mantiene en forma permanente al igual que lo observado en el TEC. En este caso el seguimiento se hizo hasta los 6 meses de edad postnatal. Considerando la distancia temporal entre el final del entrenamiento y la última medición, puede considerarse que los cambios observados son similares al TEC en cuanto a su duración.

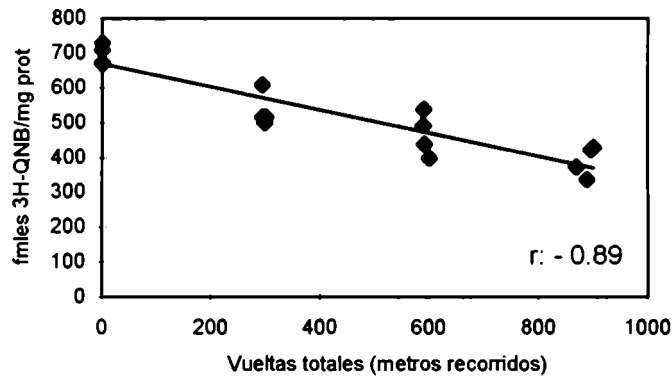


**Figura 17. Duración de los cambios del mAChR en cuerpo estriado luego del TDG.** Animales machos fueron entrenados a los 30 días de edad en el TDG y sacrificados a distintos tiempos postentrenamientos, entre los 90 y 180 días de edad. *n* de cada grupo: 9. (\*) *p* < 0.001.

### 3.3.1.2.3. La caída está relacionada con la distancia recorrida

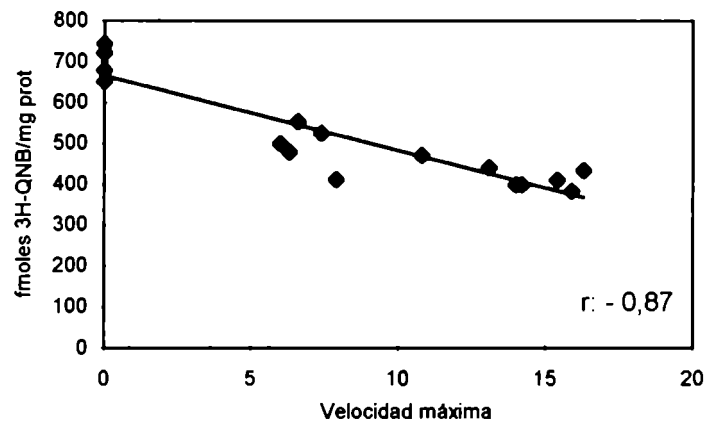
La figura 18 muestra la relación entre la caída del receptor y el número de sesiones en el TDG. El entrenamiento produce una caída de 23, 33 y 44% luego de 300, 600 y 900 vueltas, respectivamente. Comparando con los datos obtenidos para el TEC (ver también la figura 12), el efecto de la actividad motora en el TDG sobre la densidad del mAChR es similar a lo observado anteriormente. Aunque para cada grupo experimental la caída resulta mayor en el TDG que en el TEC, dicha variación no es significativa. De

todos modos, la correlación entre las variables en estudio parece ser relativamente más fuerte en el TDG que en el TEC.



**Figura 18. TDG en machos de 30 días: relación mAChR/metros recorridos.** Animales machos de 30 días de edad fueron entrenados en el TDG por distinto número de sesiones de manera de obtener una respuesta motora diferencial para cada uno. Posteriormente, fue determinado el nivel de mAChR en cuerpo estriado y este valor graficado en función de la distancia recorrida;  $n = 16$ ,  $r = -0.89$ ,  $p < 0.001$ .

#### 3.3.1.2.4. También está asociada con la velocidad de giro

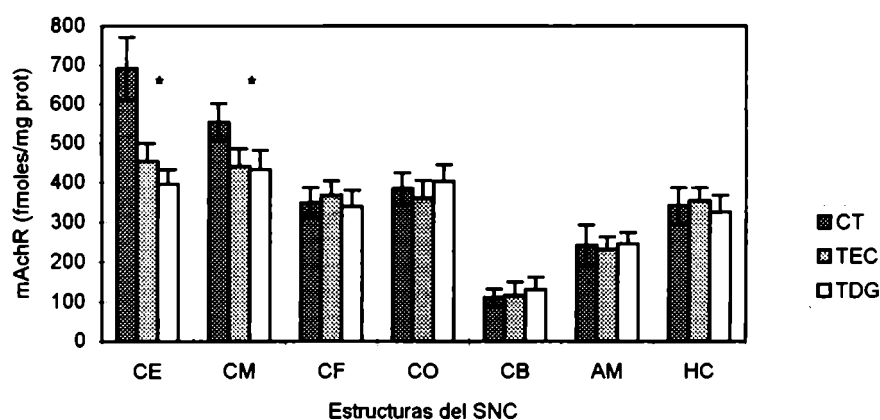


**Figura 19. TDG en machos de 30 días de edad: relación mAChR/intensidad de giro.**



La figura 19 muestra la relación entre la velocidad de giro, promedio de las 7 sesiones, y el grado de caída del mAChR en animales machos entrenados a los 30 días de edad en el TDG. Claramente, puede observarse que la caída es mayor en aquellos animales que corrieron a mayor velocidad. El coeficiente de correlación ( $r: -0.87, p < 0.001$ ) indica que la asociación entre los niveles de mAChR y la velocidad de giro es mucho más notoria que la observada en el TEC.

### 3.3.1.3. Efectos de la actividad funcional sobre el mAChR en distintas áreas cerebrales luego del TEC y el TDG



**Figura 20. Efecto del entrenamiento sobre el mAChR en distintas áreas del SNC.** Animales machos de 30 días de edad fueron entrenados a durante 7 sesiones en el TEC o el TDG y los niveles de mAChR a los 90 días de edad comparados contra controles no entrenados (CT). CE: cuerpo estriado, CM: corteza motora, CF: corteza frontal, CO: corteza occipital, CB: cerebelo, AM: amígdala, HC: hipocampo. El análisis de ANOVA demostró diferencias significativas y el estudio «a posteriori» de Dunnet indicó que el entrenamiento producía una reducción significativa de los niveles de mAChR (\*), en cuerpo estriado ( $p: 0.001$ ) y corteza motora ( $p < 0.05$ ).

Los resultados descriptos hasta el momento centraron el análisis del mAChR en el cuerpo estriado como primera estructura blanco del estudio. La respuesta del sistema colinérgico muscarínico estriatal puede representar un cambio específico del cuerpo estriado o involucrar otras estructuras nerviosas. Dada la complejidad de las pruebas

conductuales utilizadas, la observación de cambios neuroquímicos similares en otras áreas es posible. Por lo tanto, un nuevo objetivo fue evaluar la respuesta del sistema colinérgico en otras áreas cerebrales luego del entrenamiento en el TEC y el TDG. La figura 20 muestra los niveles del mAChR detectados por ensayo de unión por ligando específico en distintas estructuras del SNC luego de realizado los test en dos grupos de animales independientes.

Luego del entrenamiento de ratas machos a partir de los 30 días de edad en el TEC (S0-S7), los animales fueron sacrificados a los 90 días y distintas áreas cerebrales disecadas. El cuerpo estriado y la corteza motora muestran los niveles más altos de mAChR entre los grupos controles, aunque en todos se observan valores importantes de receptor. Como se describiera anteriormente, el entrenamiento en el TEC produce una caída significativa del mencionado receptor en el cuerpo estriado. El hipocampo, cerebelo, amígdala, corteza frontal y occipital, no muestran cambios a largo plazo en los niveles de mAChR ( $p > 0.1$ ,  $n: 6$ ). Por el contrario, la corteza motora muestra una caída del  $20 \pm 3\%$  en los animales entrenados ( $n: 8$ ,  $p < 0.05$ ).

El mismo análisis fue realizado luego de la actividad en el TDG bajo idéntico esquema de entrenamiento, tiempo de sacrificio y características de los animales. También para este grupo, se observa una caída en el cuerpo estriado, ya descrita, y una reducción significativa del B<sub>máx</sub> del mAChR en la corteza motora ( $24 \pm 5\%$ ,  $n: 7$ ,  $p < 0.05$ ). Del mismo modo, la determinación de los niveles del mAChR en el resto de las estructuras estudiadas no muestran variaciones con respecto a los valores normales ( $p > 0.1$ ,  $n: 7$ ).

En corteza motora los niveles cuantificados para el mAChR fueron: control:  $554 \pm 47$ , TEC:  $441 \pm 45$  y TDG:  $433 \pm 49$  fmoles/mg prot.

### **3.3.2. Efectos a largo plazo sobre otros marcadores moleculares**

#### **3.3.2.1. Determinación de otros neuroreceptores**

Como se describiera en la introducción, el sistema colinérgico muscarínico está altamente integrado con otros sistemas de neurotransmisión en el cuerpo estriado. En

esta sección se analizó si los cambios observados en el mAChR como resultado del TEC involucra a otros neuroreceptores por igual.

**TABLA 13**  
**EFFECTOS DEL ENTRENAMIENTO A DISTINTAS EDADES SOBRE LOS**  
**NIVELES DEL RECEPTOR DOPAMINERGICO D2 EN CUERPO ESTRIADO**

Edad al entrenamiento	Unión de $^3\text{H}$ -Siperona (fmoles/mg proteína)	
	Controles	Entrenados
20	363 ± 49	312 ± 43
30	337 ± 53	202 ± 26#
60	338 ± 45	295 ± 31

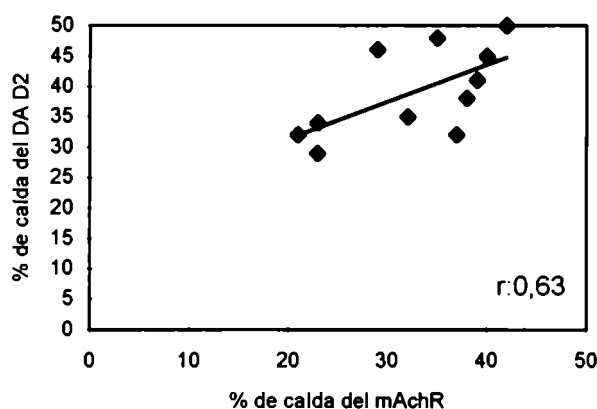
*Los animales fueron sacrificados a los 100 días de edad. La unión de  $^3\text{H}$ -Siperona permite la determinación de los niveles del receptor dopaminérgico D2. Los valores fueron expresados como el promedio ± el desvio estándar. # Diferencia significativa respecto al grupo control,  $p < 0.001$ ,  $n = 8$ .*

### 3.3.2.1.1. Receptor dopaminérgico D2: correlación con el mAChR

La tabla 13 muestra la determinación del Bmax del receptor dopaminérgico subtipo D2 mediante el ensayo de unión del ligando específico  $^3\text{H}$ -Siperona en animales machos entrenados a los 20, 30 y 60 en el TEC (S0-S7) y sacrificados a los 90 días de edad. Como puede apreciarse, el entrenamiento a partir de los 30 días de edad produce una caída significativa del Bmax ( $41 \pm 5\%$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 8$ ). Esta reducción en la densidad del receptor D2 sólo se observa en mismo período de sensibilidad para los cambios del receptor colinérgico muscarínico. El entrenamiento a los 20 o 60 días de edad no afecta los niveles de binding.

En un experimento realizado con animales machos entrenados a partir de los 30 días de edad en el TEC (S0-S7), se correlacionaron los niveles del mAChR y el receptor

dopaminérgico D2. La figura 21 muestra la curva obtenida a partir de graficar para cada animal los valores de ambos receptores. De los datos se puede calcular una correlación significativa entre ambas variables ( $r: 0.63$ ,  $p < 0.01$ ,  $n: 8$ ), lo que indica que la caída del receptor dopaminérgico D2 esta vinculada a la reducción en el mAChR.



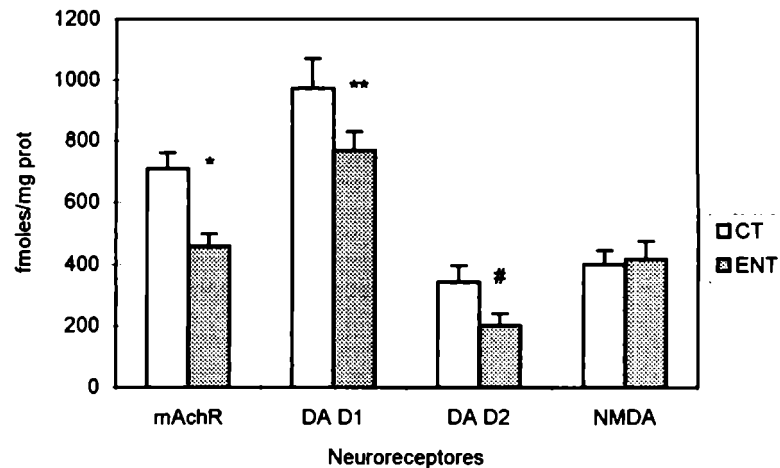
**Figura 21. Correlación entre el mAChR y el receptor dopaminérgico D2.**

*Animales machos de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC durante 7 sesiones y sacrificados a los 100 días de edad. Para cada animal, se graficó el porcentaje de reducción del mAChR vs el correspondiente al receptor dopaminérgico.*

### 3.3.2.1.2. Receptor dopaminérgico D1 y de glutamato tipo NMDA

Animales entrenados a partir de los 30 días de edad en el TEC (S0-S7) fueron sacrificados a los 90 días. Luego de la disección del cuerpo estriado, se determinaron los valores de  $B_{\max}$  del receptor de glutamato tipo NMDA mediante el empleo del ligando específico MK-801 y del receptor dopaminérgico tipo D1 a través del ligando SCH23390. Los niveles determinados se muestran, junto con los valores correspondientes de mAChR y D2 de dicho grupo experimental, en la figura 22. A partir de los mismos, se puede comprobar que el TEC produce una caída significativa del  $22 \pm 6\%$  en el receptor dopaminérgico D1, mientras que no modifica los niveles del receptor glutamatérgico tipo NMDA. De este modo, luego del entrenamiento los sistemas colinérgico (mAChR) y dopaminérgico (tanto D1 como D2) muestran una

alteración remanente a largo plazo, mientras que el sistema glutamatérgico no muestra variaciones a dichos tiempos.



**Figura 22. Efecto del TEC sobre los neuroreceptores del cuerpo estriado.**

Animales machos de 30 días de edad fueron entrenados en el TEC durante 7 sesiones consecutivas (S1-S7). Los animales fueron sacrificados entre los 90 y 100 días de edad, y los niveles de distintos neuroreceptores en el cuerpo estriado fueron comparados con los valores determinados a partir de animales controles (CT) no entrenados de similar edad. (\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p = 0.038$ , (=)  $p = 0.02$ .

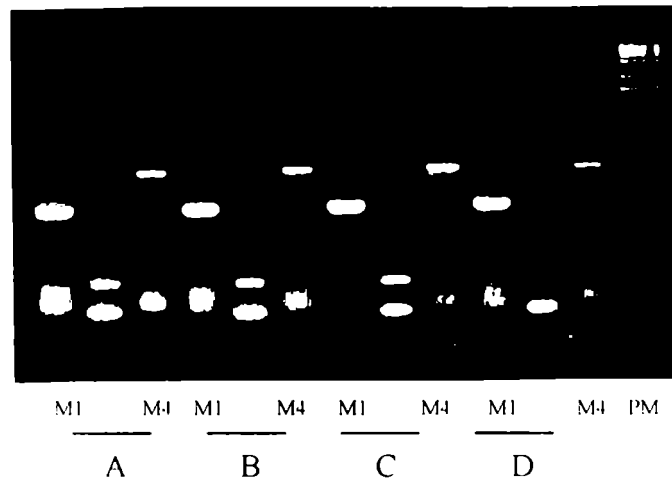
### 3.3.2.2. Cambios a largo plazo en la transcripción del mAChR

Los cambios a largo plazo observados sobre el sistema colinérgico pueden ser analizados desde otra perspectiva estudiando los efectos del TEC en la expresión del ARN del mAChR. Por otra parte, utilizando técnicas adecuadas puede diferenciarse el análisis de los 2 subtipos más importantes del receptor en el cuerpo estriado y corteza motora (M1 y M4), evaluación que resulta muy difícil por técnicas de unión por ligando.

#### 3.3.2.2.1. Especificidad de las sondas

En forma previa a los análisis de expresión del ARNm por RT-PCR se realizaron algunos experimentos a partir de ADN genómico extraído de corteza total. Mediante

este material y utilizando la técnica de amplificación por PCR a partir de primers específicos para los subtipos del mAChR M1 y M4, se pudo evaluar distintos puntos importantes.



**Figura 23. Amplificación de los subtipos M1 y M4 por PCR a partir de ADN genómico.** El ADN extraído fue sometido a la técnica de RT-PCR en distintas condiciones experimentales. A: amplificación con enzima Taq polimerasa Perkin-Elmer. B: amplificación con enzima BRL. C: idem A pero con 40 ciclos. D: amplificación con enzima Estratagene. En todos los casos, con excepción de C, se amplificaron 30 ciclos. El producto M1 (373 pb) y M4 (588 pb) es la banda superior más notoria en la calle correspondiente a la amplificación de cada subtipo.

En primer lugar por esta técnica se amplifica una única banda y del tamaño esperado según datos de referencia, de 373 pb y 588 pb, para el M1 y el M4, respectivamente (figura 23). La presencia de bandas dobles de bajo PM corresponden a los primers no hibridizados ni consumidos en la reacción, tanto en su forma simple, como posiblemente en forma de dímeros. Aunque puede observarse claramente dicho artefacto técnico, esta situación no afecta la realización o interpretación de las reacciones de RT-PCR. Las distintas calles muestran los resultados de amplificación con distintas condiciones técnicas y se puede observar que en todos los casos la amplificación fue exitosa para el M1 y el M4.

### 3.3.2.2.2. Extracción de ARN en los distintos grupos experimentales

Previamente al análisis por RT-PCR se realizó una comparación entre los ARN extraídos en las distintos grupos experimentales para confirmar que no existen diferencias de calidad o rendimiento intergrupales.

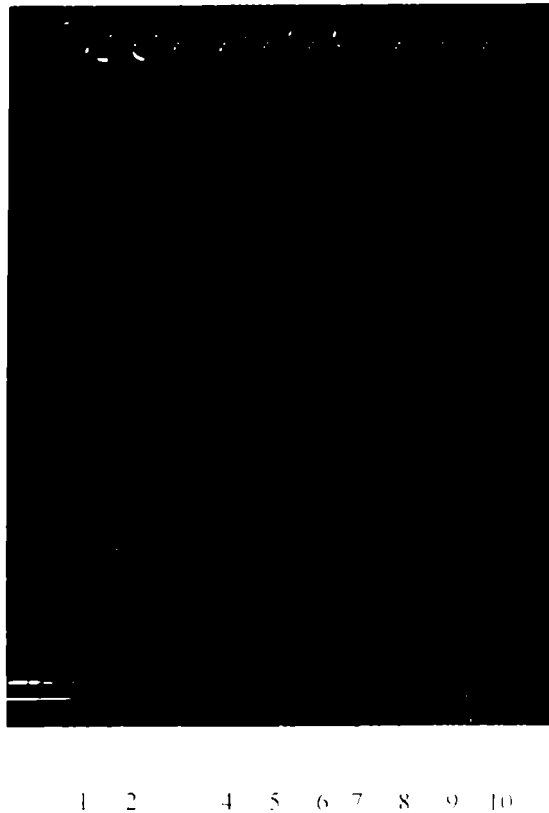
**TABLA 14**  
**RENDIMIENTO Y PUREZA DE LA EXTRACCION DE ARN DE CEREBRO**

		Rendimiento ( $\mu\text{g RNA/mg tejido}$ )	D.O 260/D.O 280
Animales controles:	CED	$1.18 \pm 0.10$	$1.87 \pm 0.06$
	CEI	$1.09 \pm 0.09$	$1.91 \pm 0.07$
Animales entrenados:	CED	$1.07 \pm 0.08$	$1.88 \pm 0.08$
	CEI	$1.13 \pm 0.06$	$1.81 \pm 0.06$

*Extracción de ARN de cuerpo estriado. (CED): cuerpo estriado derecho, (CEI): cuerpo estriado izquierdo. Fue considerado como índice de alta pureza la relación de DO 260/280 > 1.8.*

La tabla 14 muestra que tanto los animales entrenados a los 30 días como sus controles muestran niveles comparables de rendimiento ( $\mu\text{g/mg tejido}$ ), pureza (DO 260/280) e integridad. Esta última fue evaluada por la integridad de las dos bandas correspondientes al ARN ribosomal 18S y 28S y la ausencia de productos de degradación de los mismos como se muestra en la figura 24. También se observa en la zona inferior la tenue presencia de ARN de transferencia de mucho menor PM. Por último el ADN copia, obtenido a partir de una extracción típica de ARN presenta un producto que bandea entre 0.5 y 2 kilobases, lo que verifica su correcta retranscripción. Para poder realizar esta verificación, se realizó una copia utilizando un nucleótido

radioactivo. Se realizó una corrida electroforética con estándares de PM para poder relacionar posteriormente el lugar de aparición radioactiva con la posición en el gel y el tamaño respectivo y luego el gel fue autorradiografiado. La autorradiografía muestra efectivamente que el producto de ADN copia presenta un promedio de 1.8 kb verificando así la calidad de la transcripción reversa.



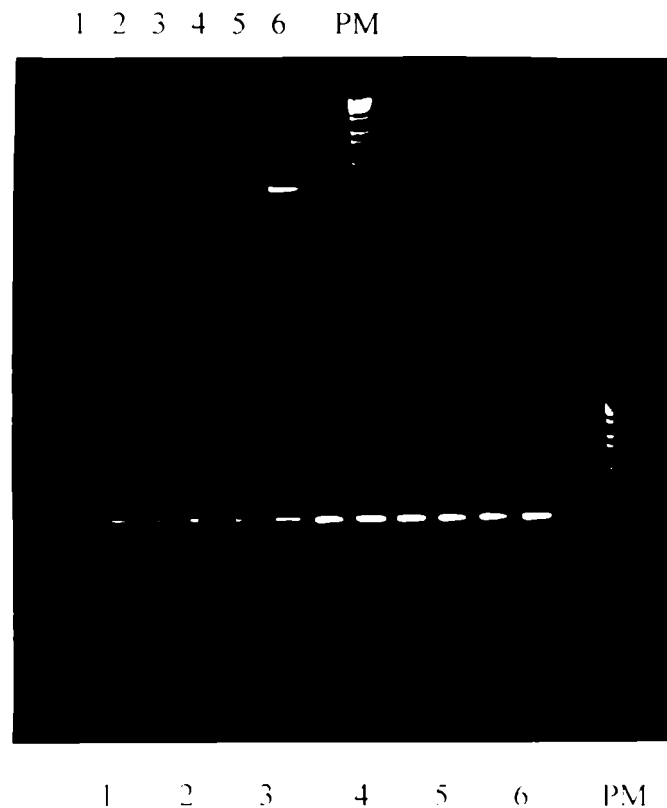
**Figura 24.** *Electroforesis del ARN extraído de animales controles y entrenados.* Las calles 1, 2, 3, 7 y 8 corresponden al ARN extraído de cuerpo estriado de animales controles y calles 4, 5, 6, 9 y 10, corresponde al obtenido a partir de animales entrenados a los 30 días de edad.

### 3.3.2.2.3. Transcripción del mAChR. RT-PCR de los subtipos M1 y M4

Se evaluaron, un total de 15 animales entrenados y 15 controles correspondientes a 5 estudios experimentales diferentes de n: 3 cada uno. En todos los casos los animales fueron mantenidos vivos 50 días después del entrenamiento.



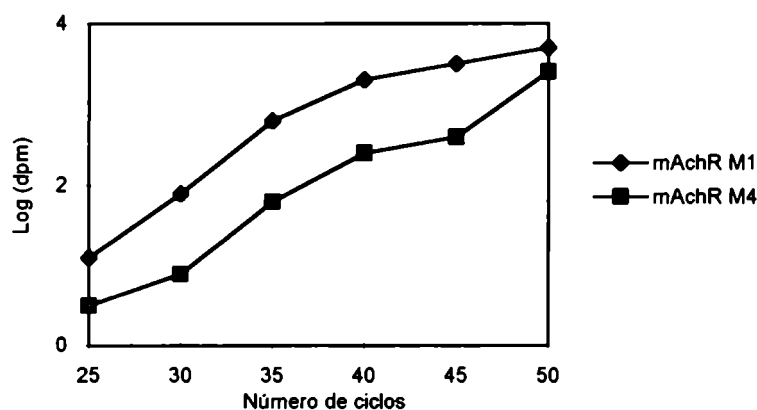
En primer lugar se realizaron para cada subtipo una curva de amplificación con distinto número de ciclos (figura 25).



**Figura 25. Electroforesis del producto de distintos ciclos de amplificación del los subtipos M1 y M4.** Luego de la amplificación alcuotas de cada muestra fueron sembradas en geles de acrilamida y, luego de la corrida electroforética, visualizados con bromuro de etidio. La fotografía muestra la imagen de 2 geles superpuestos. El superior con productos de amplificación del subtipo M4 del mAChR, mientras que el gel inferior representa amplificaciones del subtipo M1 del receptor colinérgico. En ambos casos las calles 1 corresponden a la amplificación con 25 ciclos, 2: 30 ciclos, 3: 35 ciclos, 4: 40 ciclos, 5: 45 ciclos y 6: 50 ciclos. Para el subtipo, M1 las amplificaciones se muestran por duplicado. PM: marcadores de peso molecular.

Dado que se utilizaron primers marcados radioactivamente, el producto de amplificación se eluyó y cuantificó. La figura 26 muestra que entre los 25 y 35 ciclos de amplificación la técnica muestra una relación exponencial que, al realizar una función logarítmica, muestra un función lineal indicando que no existe saturación. Esto es

importante ya que para poder comparar relativamente los productos amplificados entre sí (control vs entrenado para cada subtipo) es necesario asegurarse que la intensidad de la banda es proporcional a la cantidad de material, situación que se desvirtúa en condiciones de saturación de la amplificación.



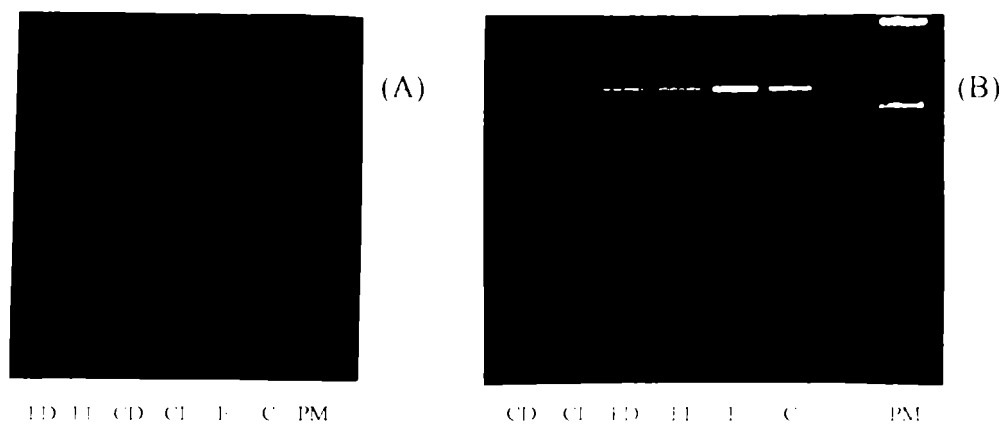
**Figura 26. Amplificación por PCR de los subtipos M1 y M4 del mAChR.**

*El gráfico muestra la cuantificación del producto de elución de las amplificaciones que se muestran en la figura 25.*

La figura 27 presenta una RT-PCR típica obtenida a partir de la amplificación por 30 ciclos de ARN de cuerpo estriado de animales controles y entrenados para M1 y M4. La fotografía muestra el gel de electroforesis con bromuro de etidio corrido con el producto de amplificación. La evaluación cualitativa de los productos amplificados sugiere un aumento relativo evidente en el subtipo M4 para los animales entrenados respecto a los controles, mientras que la amplificación del subtipo M1 parece ser relativamente similar.

La cuantificación relativa se realizó mediante la determinación  $^{32}\text{P}$  incorporado en el producto. Los resultados vertidos en la tabla 15 permiten comprobar que, en función de esta metodología analítica, el entrenamiento provoca, efectivamente, un aumento en los niveles del ARNm M4. Este incremento es de aproximadamente 3 veces el valor

obtenido para los animales controles en las condiciones experimentales utilizadas. Respecto al subtipo M1 se observó una caída cercana al 50% en los animales entrenados en relación a los controles. Si bien las diferencias fueron poco significativas, los cambios fueron pronunciados. Un problema inherente al aspecto técnico es la marcada variabilidad de la detección por la técnica de PCR. No obstante esta situación, se puede considerar también que la baja significatividad esté asociada al relativo bajo número de estudios realizados.



**Figura 27. Expresión de ARNm de los subtipos M1 y M4 del mAChR.** El ARN extraído a partir de cuerpo estriado de animales controles y entrenados fue amplificado para determinar la expresión del subtipo M1 (imagen A) y M4 (imagen B). El significado de las siglas bajo cada calle se expresan a continuación. ED: entrenado, cuerpo estriado derecho; EI: entrenado, cuerpo estriado izquierdo; CD: control, cuerpo estriado derecho; CI: control, cuerpo estriado izquierdo; E: entrenado, cuerpo estriado derecho e izquierdo; C: control, cuerpo estriado izquierdo y derecho. PM: marcadores de peso molecular

### 3.3.2.3. Determinación de acetilcolinesterasa

Muestras de fracción sinaptosómica, obtenidas de animales entrenados bajo el paradigma del TEC y del TDG, así como animales controles, fueron utilizadas para la determinación de la actividad de AchE por un método espectrofotométrico. Dicha determinación demostró que la actividad de esta enzima fue de  $57.2 \pm 4.8$ ,  $43.6 \pm 5.4$  y  $46.5 \pm 5.1$  nmol min<sup>-1</sup> mg prot en animales controles, entrenados en el TEC y entrenados

en el TDG, respectivamente. Estos valores representan una caída del 24 y 29% para el entrenamiento en el TDG y en el TEC, respecto al control. El análisis de ANOVA indica que esta diferencia no son significativa, ( $p < 0.05$ ,  $n: 4$ )

**TABLA 15**  
**EFEECTO DEL ENTRENAMIENTO CIRCULAR SOBRE LA EXPRESION DEL**  
**mACHR EN CUERPO ESTRIADO**

	Subtipo M1 (25 ciclos)	Subtipo M4 (30 ciclos)
	CPM incorporadas x $10^{-3}/\mu\text{l}$ de producto	
Animales controles	8.3 ± 2.9	5.5 ± 1.6
Animales entrenados	4.1 ± 2.9*	15.4 ± 4.4 #
-----		
% de variación		
entrenado vs controles	- 51 %	+ 280 %

*Incorporación de  $^{32}\text{P}$  en la amplificación de mRNA de M1 y M4 de cuerpo estriado de animales controles y entrenados. El valor promedio : el desvío estándar se obtiene de promediar el resultado de 4 experimentos independientes, en cada uno de los cuales se utilizaron 4 animales. Los estudios se realizaron amplificando una cantidad de ciclos en la cual no se produce la saturación de la reacción de PCR. \* Las diferencias entre controles y entrenados para el subtipo M1 es de baja significatividad ( $p: 0.0865$ ,  $n: 4$ ). #: Diferencias significativas respecto al control ( $p: 0.01$ ,  $n: 4$ ).*

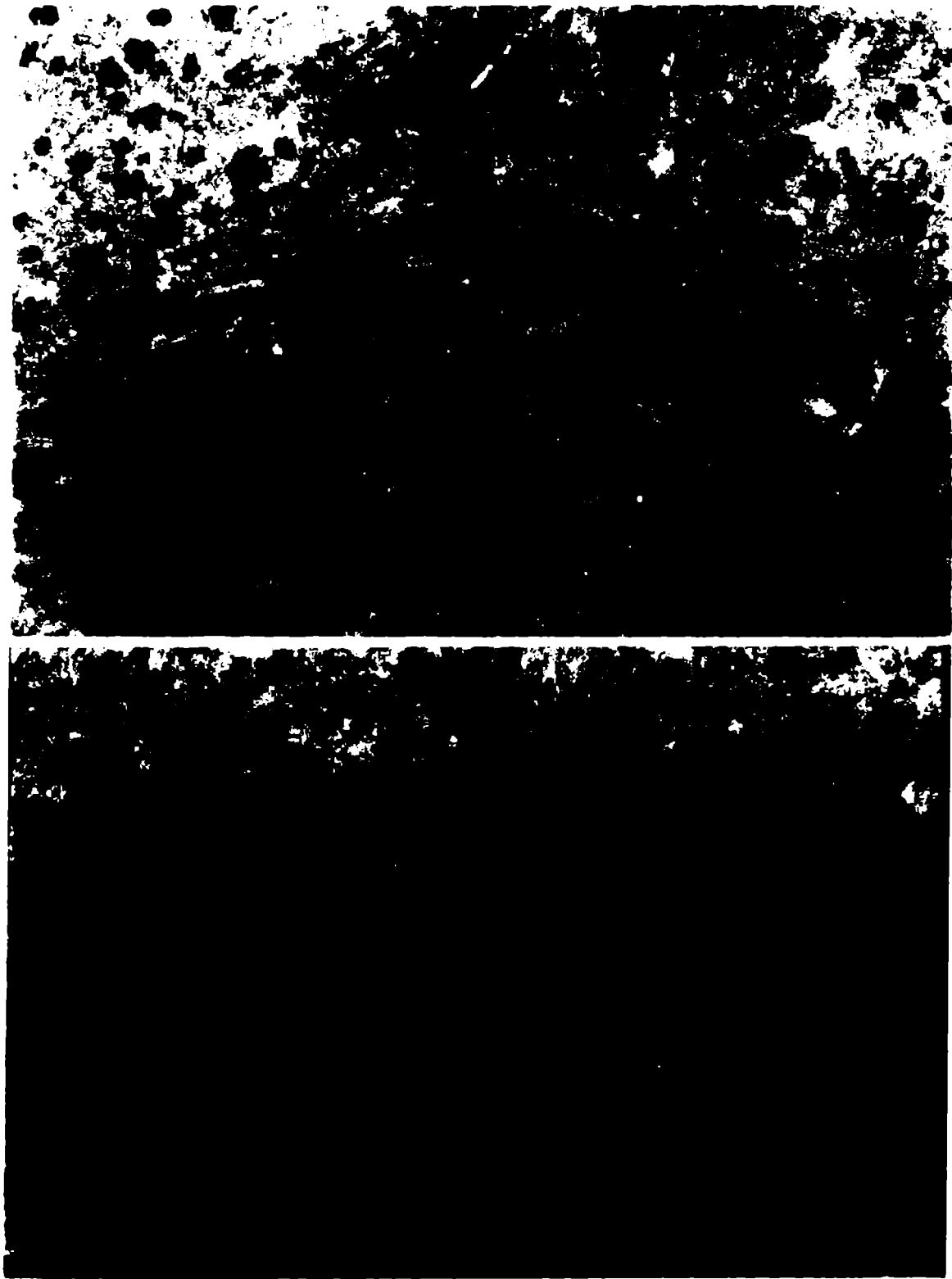
#### 3.3.2.4. Evaluación de marcadores inmunohistoquímicos

Los estudios del sistema colinérgico permiten confirmar que el entrenamiento en el TEC y el TDG producen cambios bioquímicos posiblemente correlacionados con modificaciones de los circuitos funcionales. En esta sección se realizaron estudios inmunohistoquímicos sobre el cuerpo estriado para poder evaluar, a partir de algunos marcadores particulares, si existe cambios estructurales y/o fisiológicos complementarios a los cambios observados en los receptores. Para ello, se caracterizó el

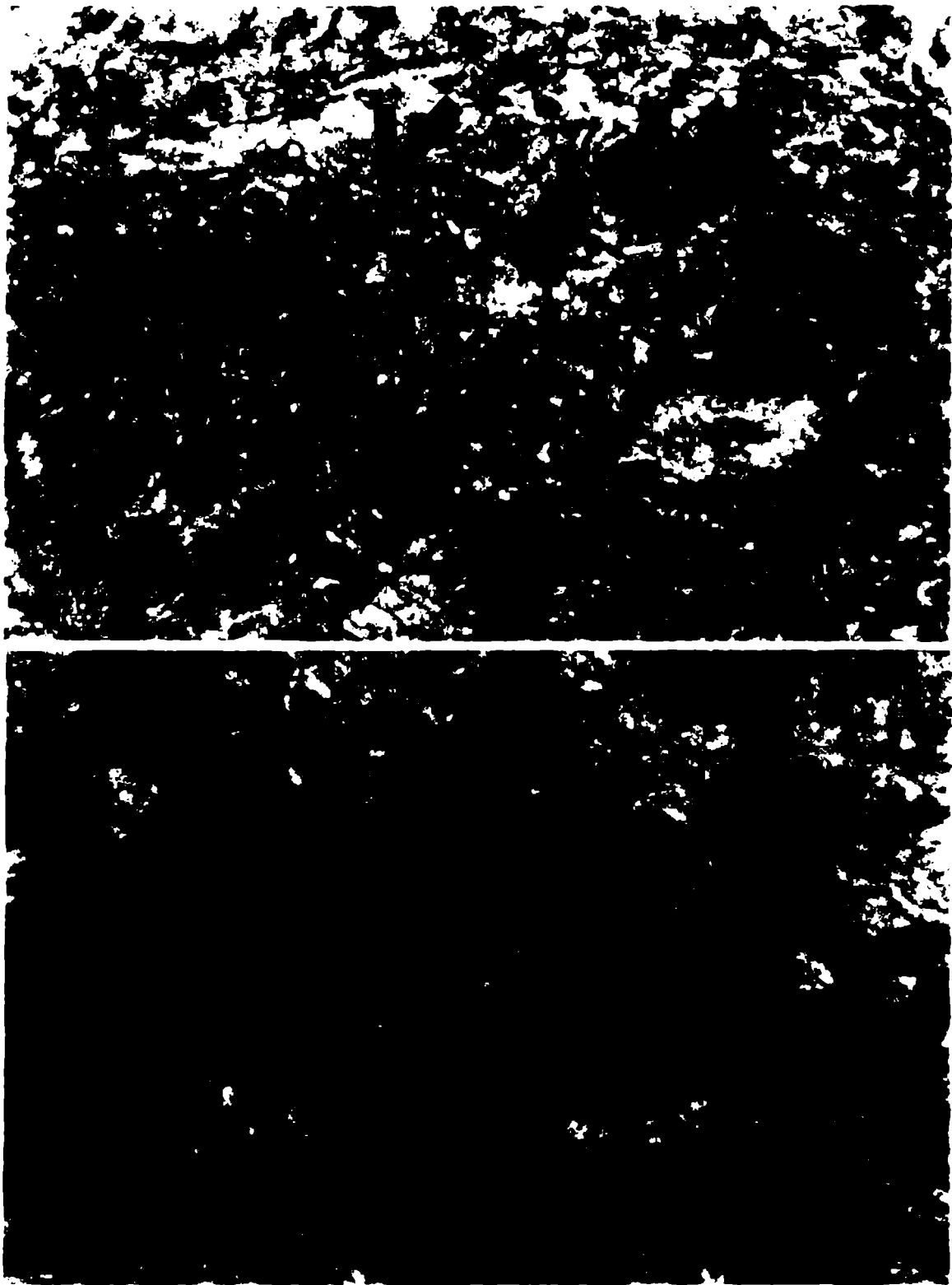
patrón de distribución de la GFAP y de los NF en cuerpo estriado. Se comparó la inmunomarcación de animales entrenados a los 30 días en el TDG y sacrificados 50 días después de finalizado el entrenamiento con sus respectivos controles.

Las figuras 28 y 29 muestran imágenes características, obtenidas luego de inmunomarcación para NF en cortes de cuerpo estriado de animales controles y entrenados. A menor aumento (40x) se puede observar en la fotografía correspondiente al cuerpo estriado control diversas zonas delimitadas de inmunomarcación positiva (figura 28A). Una de las tantas áreas mencionadas se encuentra indicada con una flecha sobre la fotografía. De la observación de la imagen, puede establecerse que sólo algunas áreas dendríticas son inmunomarcadas. Probablemente, la capacidad de observar esta imagen esté relacionada en parte con la mayor densidad de la arborización dendrítica de las neuronas en determinadas áreas enriquecidas en terminales y en parte porque, quizás debido a la concentración de anticuerpo primario utilizado y a otras condiciones técnicas, la sensibilidad de detección sea menor en aquellas estructuras con menor concentración de neurofilamentos o zonas con un número menor de contactos sinápticos.

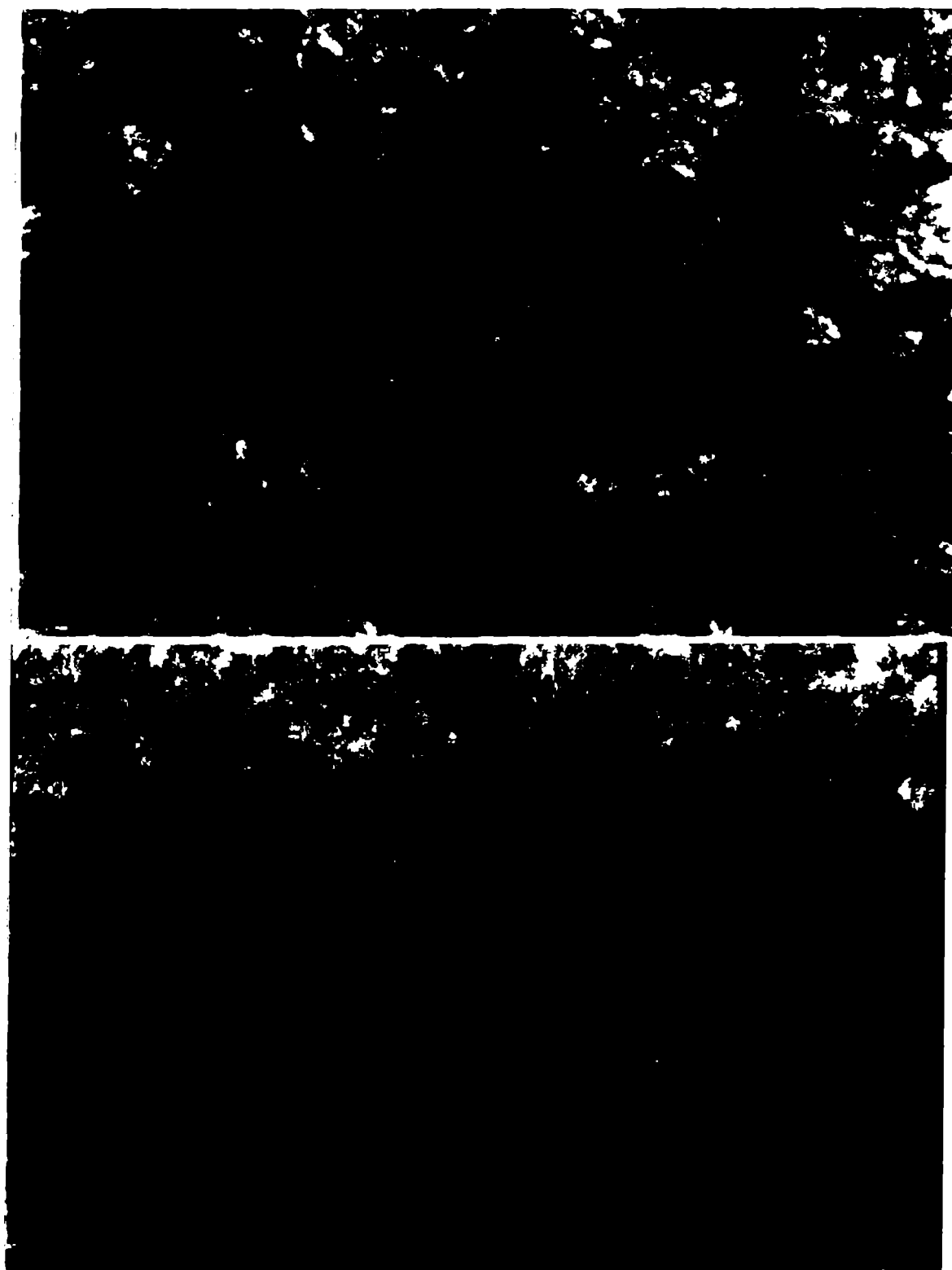
Más allá de este punto, la comparación de la imagen control con la obtenida de animales entrenados claramente permite observar la neta disminución de la inmunomarcación, al punto tal que, prácticamente, la detección se anula. Aún considerando que la sensibilidad técnica puede desempeñar un papel importante en los resultados y la inferencia no se puede hacer extensiva a toda la población neuronal, es posible comprobar que el entrenamiento produce un efecto negativo en la inmunomarcación de NF (figura 28B), lo que podría indicar una reducción del número de sinápsis. Si bien se conservan áreas con marcación positiva, claramente puede distinguirse que, tanto el número de áreas como la superficie que ocupan es menor.



**Figura 28. Inmunomarcación para NF (40X). (A) control, (B) entrenado.** Las fotografías representan imágenes típicas obtenidas por esta técnica en las condiciones experimentales evaluadas. La flecha en la figura A señala una de las áreas altamente inmunomarcada que prácticamente desaparecen o se reducen luego del entrenamiento.



*Figura 29. Inmunomarcación para NF (200X). (A) control, (B) entrenado. Las fotografías representan imágenes típicas obtenidas por esta técnica en las condiciones experimentales evaluadas. Las flechas marcan dos regiones altamente positivas y permite observar la diferencia del área que abarcan.*



*Figura 30. Inmunomarcación para GFAP (40X). (A) control, (B) entrenado. Las fotografías representan imágenes típicas obtenidas por esta técnica en las condiciones experimentales evaluadas.*



Del mismo modo, la figura 29 muestra la misma inmunomarcación, a mayor aumento (200x) y permite caracterizar en mayor detalle las consecuencias del entrenamiento para la variable bajo análisis. En este caso puede observarse en zonas positivas seleccionadas de cada tejido que la imagen obtenida del estudio control (figura 29A) muestra áreas, señaladas por la flecha, que involucran una mayor extensión y presentan más cantidad de marcas individuales dentro del sector que limita. Por el contrario, aún los sectores marcadamente positivos de la inmunomarcación correspondiente a un animal entrenado muestran una extensión pequeña comparada con los controles (figura 29B).

Por último, la figura 30 muestra unas fotografías obtenidas luego de inmunomarcación para GFAP en los mismos casos. Si bien una sola imagen no es suficiente para poder apreciar o descartar diferencias particulares en el número o características de las células marcadas, la evaluación de distintos cualitativa y semicuantitativa de distintos sectores del mismo corte, al igual que la evaluación de distintos casos (n: 5) permite comprobar que no existen variaciones notorias en la población glial de los grupos entrenados y controles.

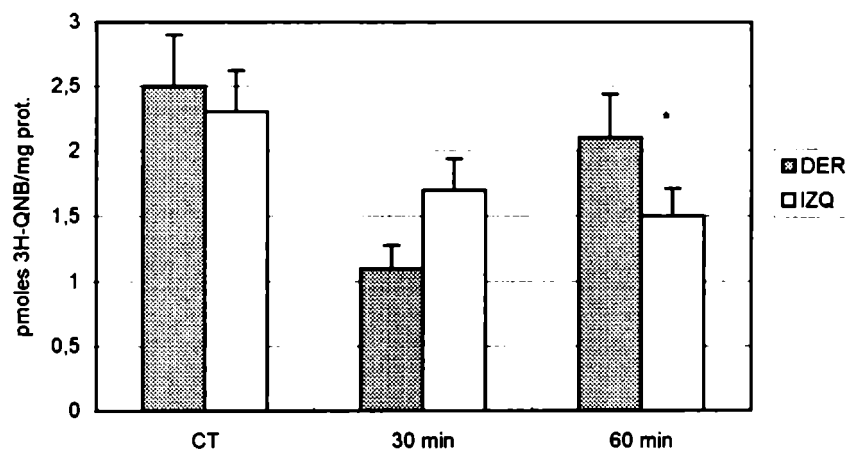
### **3.3.3. Estudios de los efectos inmediatos de la actividad funcional**

#### **3.3.3.1. Cambios inmediatos del mAChR luego del TDG**

Es razonable suponer que los cambios a largo plazo en el TEC y el TDG sean precedidos por variaciones neuroquímicos producidas en el momento mismo de realizarse la actividad funcional en la prueba conductal. Con el objeto de analizar los posibles cambios inmediatos en el sistema colinérgico muscarínico durante las pruebas conductales, se realizaron una serie de experimentos con evaluación inmediata luego del TDG. Se seleccionó el TDG pues, este test ofrece los cambios más pronunciados sobre la variable en estudio y además carece de la participación de otros componentes conductales más complejos presentes en el TEC (e.g. aprendizaje asociativo).

Parámetros que podrían participar en forma inmediata y, de este modo, podrían distorsionar el análisis de los resultados.

Para este análisis, los animales fueron entrenados durante dos sesiones y sacrificados luego de 30 min y 60 min de finalizada la última. Estos experimentos se realizaron así para intentar caracterizar los cambios que produce el entrenamiento inicialmente. La determinación de mAChR permitió comprobar que en las fracciones de tejido de los animales entrenados la unión del ligando específico se reduce notoriamente (figura 31), respecto a los niveles valores del grupo control (cuerpo estriado izquierdo: 2.5 nmol/mg prot; derecho: 2.2 nmol/mg prot).



**Figura 31. Efectos inmediatos del TDG sobre el mAChR.** Animales de 30 días de edad fueron entrenados durante 2 sesiones en el TDG y sacrificados a los 30 ó 60 min luego de finalizada la última sesión. En fracciones de membrana sináptica 1 M fue determinada la unión del ligando  $^3\text{H-QNB}$  al mAChR en cuerpo estriado izquierdo (IZQ) y derecho (DER) en condiciones de subsaturación y comparado con valores obtenidos a partir de animales controles (CT) mediante el Test de Dunnet. (\*) diferencia significativa  $p < 0.01$ , (\*\*)  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ . El desvio estándar en ningún caso superó el 14% de la medición específica.

Los animales entrenados y sacrificados a los 30 min muestran una caída promedio mayor en el cuerpo estriado derecho ( $56 \pm 8\%$ ) que en el izquierdo ( $24 \pm 4\%$ ). En ambos casos la reducción respecto a los controles es significativa, pero mayor para el cuerpo estriado derecho ( $p < 0.01$  vs  $p < 0.05$ , respectivamente). Cabe aclarar que, en este caso, el cuerpo estriado derecho representa el lado contralateral al sentido de giro, mientras que el izquierdo es el ipsilateral al sentido de giro. Por otra parte, a los 60 min, los resultados muestran una reversión de la del cambio de la unión del  $^3\text{H-QNB}$  en el cuerpo estriado derecho. Por el contrario, del lado opuesto, la reducción fue levemente más pronunciada que a los 30 minutos, lo que permite comprobar una disminución respecto al control aún más significativa ( $31 \pm 4\%$ ). Sin embargo, esta caída de la unión de  $^3\text{H-QNB}$  no alcanza a ser similar a la reducción observada a los 30 minutos en el cuerpo estriado opuesto.

**TABLA 16**  
**DETERMINACION DE UNION A  $^3\text{H-QNB}$  EN CONDICIONES DE SATURACION**  
**EVALUACION DE CAMBIOS INMEDIATOS**

	CUERPO ESTRIADO	
	DERECHO	IZQUIERDO
	(pmoles / mg prot.)	
CONTROL	$4.46 \pm 0.81$	$4.10 \pm 0.63$
ENTRENADO 30 MIN	$4.11 \pm 0.70$	$4.55 \pm 0.49$
ENTRENADO 60 MIN	$3.99 \pm 0.61$	$4.28 \pm 0.57$

*Estudio de unión de  $^3\text{H-QNB}$ , en condiciones saturantes, a membranas sinápticas de cuerpo estriado de animales entrenados a los 30 días de edad en el TDG por 2 sesiones (S1-S2) y sacrificados 30 ó 60 minutos después de la segunda sesión.*

Finalmente, en un nuevo grupo de animales se realizó el mismo esquema experimental pero sobre el material obtenido a los 30 y 60 min de terminado el entrenamiento, se

repetieron las mediciones a subsaturación pero, además, se realizó una determinación en presencia de niveles saturantes de ligando. Si bien, no se realizó un estudio característico de Scatchard con distintos puntos a subsaturación, los resultados muestran que, en condiciones de saturación, la capacidad de unión del  $^3\text{H}$ -QNB es similar en las preparaciones de los animales entrenados y controles (tabla 16).

### 3.3.3.2. Respuesta del mAChR a la fosforilación *in vitro* por pKC

Los cambios inmediatos en la afinidad del mAChR pueden estar relacionados con cambios directos o indirectos de la fosforilación de los receptores que produzcan, a su vez, una variación en su sensibilidad a la unión de ligandos. Para evaluar esta posibilidad, se aislaron membranas sinápticas 1M de animales entrenados a los 30 días en el TDG (S1-S2), material donde se observa una respuesta diferencial a la unión de ligando, como se vió anteriormente. El objetivo de este set de experimentos fue realizar una fosforilación *in vitro* de las membranas con la idea de saturar los sitios de fosforilación que directa o indirectamente influyen en la afinidad del mAChR. Al realizar esta estimulación, es posible que las condiciones de afinidad del mAChR se modifiquen diferencialmente en las muestras controles y entrenadas si entre ellas existe una respuesta diferencial de los mecanismos de fosforilación dependientes de pKC en membrana. Es decir, si un tejido presenta, respecto al otro, una composición diferente de sus sistemas de quinasas y fosforilasas de manera que al activarlas respondan de modo distinto sobre el mAChR. Si esto ocurriera, la afinidad del mAChR debería variar diferencialmente, también suponiendo que la fosforilación del mAChR modifica su afinidad.

Para estos experimentos, entonces, la estrategia consistió en incubar las membranas sinápticas, obtenidas a partir de animales entrenados y de sus controles respectivos, en condiciones que activan pKC, en presencia y en ausencia de ATP. La tabla 17 muestra el resultado de la unión a subsaturación en membranas sinápticas 1M controles y entrenadas, con y sin activación de pKC.

De su análisis se desprende que, tanto para el caso control como para el entrenado, la respuesta frente a la incubación es la misma. Si bien los niveles basales son diferentes, esto se debe a las condiciones descritas anteriormente que indican que el entrenamiento genera un cambio sustancial en la afinidad del mAChR. Por ello la incubación a subsaturación con ligando marcado muestra esta diferencia.

En condiciones que activan pKC se observa una disminución de la unión cercana al 20% en ambos casos. Lo que indica que no existe una respuesta diferencial en las membranas del grupo entrenado bajo estas condiciones. Del mismo modo, la comparación de los resultados obtenidos en presencia o ausencia de ATP indican que, en ambos grupos, el agregado de ATP exógeno no modificó la respuesta.

**TABLA 17**  
**EFFECTO DE LA FOSFORILACION POR pKC EN LA UNION AL mAChR**

(DPM x 10 <sup>-3</sup> /10 µg prot)		
Controles	Con activación (+ATP)	5.6 ± 0.7
	Con activación (-ATP)	5.3 ± 0.5
	Sin activación	6.4 ± 0.6
Entrenados	Con activación (+ATP)	2.9 ± 0.9
	Con activación (-ATP)	2.5 ± 0.6
	Sin activación	3.3 ± 0.7

*Estudio de unión de <sup>3</sup>H-QNB a membranas sinápticas de cuerpo estriado de entrenados a los 30 días de edad en el TDG por 2 sesiones (S1-S2) y sacrificados 30 minutos después de la segunda sesión. Las condiciones de activación consisten en la incubación con un buffer con calcio, magnesio y calmodulina. Todos los animales entrenados, independientemente del subtratamiento, mostraron diferencias significativas con respecto a los controles ( $p < 0.01$ ). En cada grupo experimental, controles y entrenados, no se detectaron diferencias entre los distintos subtratamientos.*

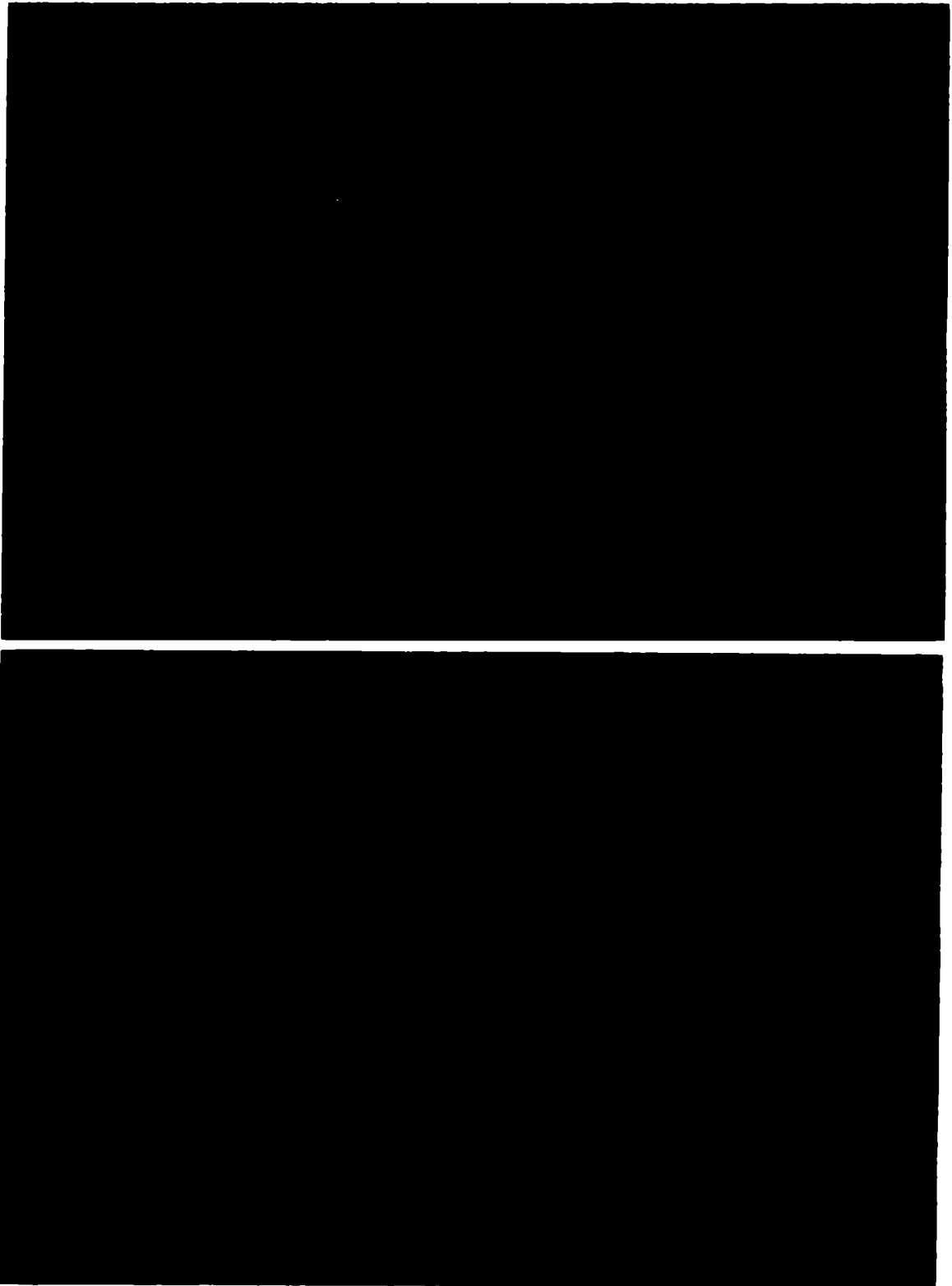
### 3.3.3.3. Determinación de la expresión del c-fos

Se evaluó por el método inmunohistoquímico la posible participación de la proteína del proto-oncogén c-fos en los cambios plásticos descritos. Para ello, se entrenaron animales a los 30 días de edad en el TEC, los que fueron sacrificados 3 hs después de realizar la sesión S2. El tiempo del sacrificio fue seleccionado bajo la hipótesis que el entrenamiento desencadena en forma inmediata la expresión del proto-oncogén c-fos. De esta manera, una vez estimulada la transcripción, el tiempo necesario para detectar inmunohistoquímicamente el correspondiente producto protéico antigénico es de aproximadamente 3 hs.

La figura 32 muestra una imagen característica del cuerpo estriado luego del entrenamiento. Aún con un revelado algo excesivo que aumenta la coloración de fondo también, la imagen a menor aumento (40x, figura 32A) permite observar la zona central de un corte coronal de cuerpo estriado. La fotografía demuestra que ambos lados de la estructura (cuerpo estriado izquierdo y derecho) muestran núcleos neuronales donde la presencia de antigenicidad contra c-fos es evidente (las cabezas de flecha marcan algunos ejemplos). La segunda fotografía (figura 32B), a mayor aumento (400x) permite analizar en detalle la positividad nuclear (flecha rellena), al mismo tiempo que se observan otras células negativas (flecha vacía).

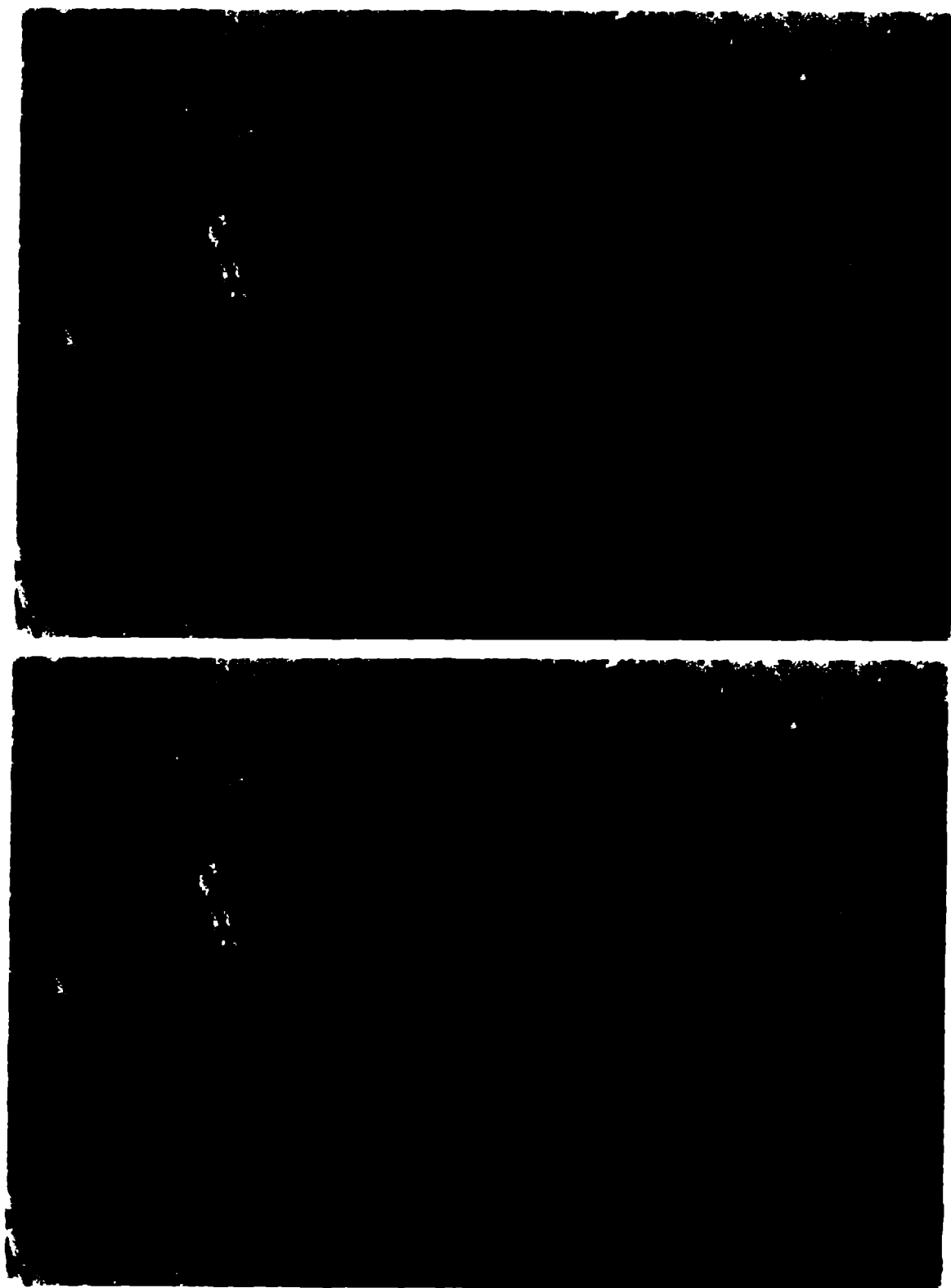
Por otra parte, la figura 33 permite comparar los resultados del entrenamiento (A) con una inmunomarcación positiva obtenida mediante la administración de metrazol (figura 33B), que representa un control positivo. El metrazol es un anticonvulsivante que desencadena la expresión de proto-oncogén c-fos en cerebro. Dichas imágenes permiten notar que el disparo del c-fos luego del entrenamiento es menor en intensidad y número de neuronas activadas que el control positivo. Las flechas en ambas fotografías indican la posición de núcleos positivos donde puede observarse fácilmente la diferencia de intensidad.

Considerando los núcleos celulares correspondientes a neuronas en distintos cortes realizados, aproximadamente el  $9 \pm 5$  % de las neuronas expresan el c-fos en los animales entrenados, a juzgar por la cuantificación visual promedio de distintos casos y cortes. En el control positivo, en cambio, entre el 50 y el 75% de las neuronas lo expresan, mientras que los animales no entrenados que no recibieron metrazol (control negativo) no expresan c-fos en ningún caso como se ve en la figura siguiente. Precisamente, la figura 34 muestra dos imágenes (200x), una correspondiente a un tejido control negativo (A) y la otra a un caso entrenado (B). Se puede ver que, mientras que el control no muestra inmunomarcación positiva, en el animal entrenado, las pocas células que lo expresan lo hacen en una forma perfectamente detectable.

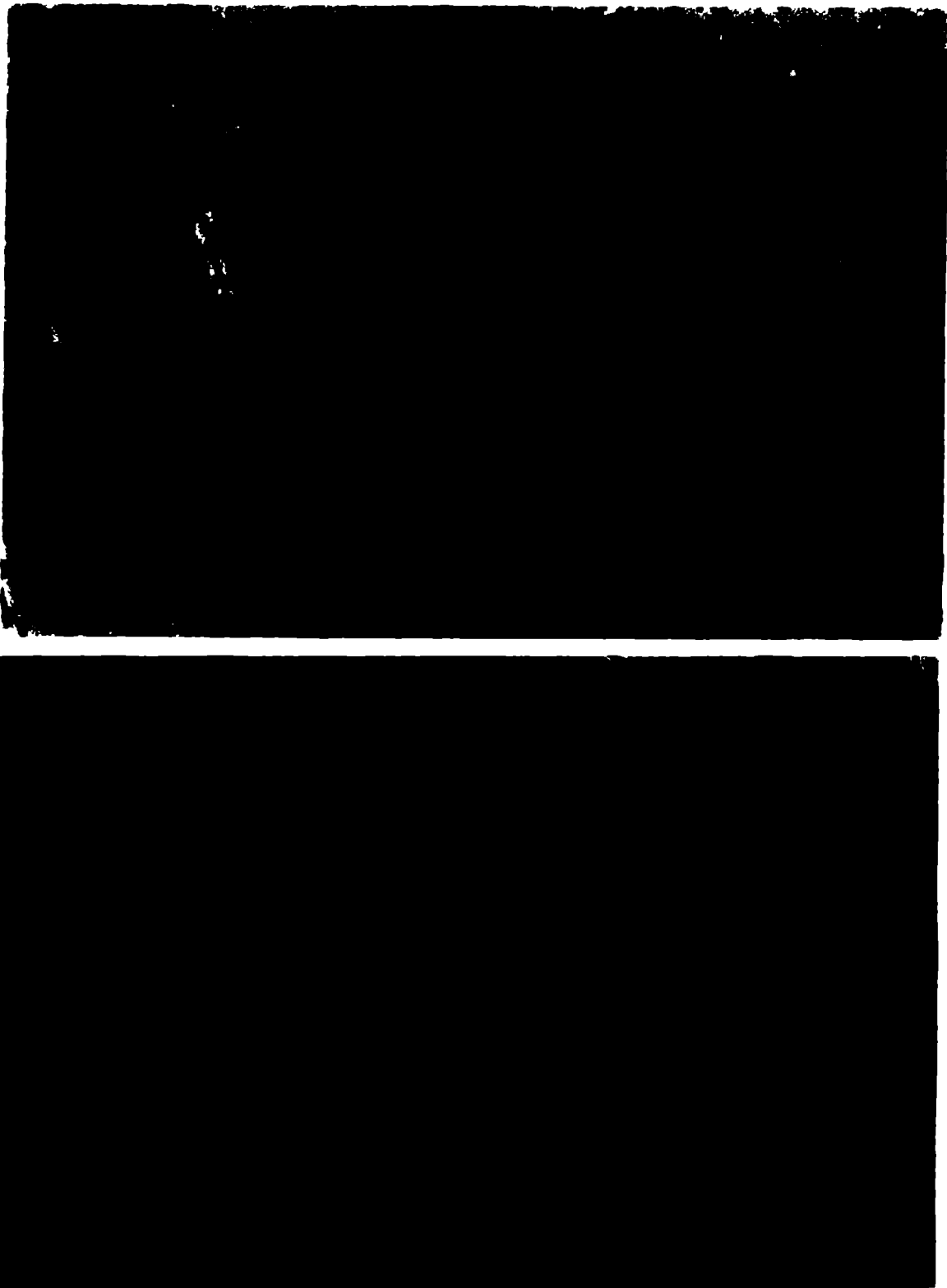


*Figura 32. Inmunomarcación para c-fos: (A) corte de un animal entrenado (40X). Las cabezas de flecha señalan núcleos positivos; (B) marcación de un animal entrenado (400X). La flecha rellena marca un núcleo positivo y la flecha vacía una célula negativa.*





*Figura 33. Inmunomarcación para c-fos (100X). (A) entrenado, (B) control positivo metrazol. Las flechas muestran nucleos positivos en ambos cortes que permiten comparar la diferente intensidad de la marcación.*



*Figura 34. Inmunomarcación para c-fos (200X). (A) control, (B) entrenado. Las fotografías representan imágenes típicas obtenidas por esta técnica en las condiciones experimentales evaluadas. Las flechas indican la posición de nucleos positivos.*

## **4. DISCUSION**

### **4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL: SELECCION DEL MODELO**

### **4.2. DEMOSTRACION DE UN PERIODO CRITICO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL CUERPO ESTRIADO**

### **4.3. EL GRADO DE ALTERACION NEUROQUIMICA DEPENDE DEL GRADO DE ESTIMULO MOTOR**

### **4.4. LOS CAMBIOS PERMANENTES EN EL mACHR SE CORRELACIONAN CON CAMBIOS INMEDIATOS**

### **4.5. IMPORTANCIA BIOLOGICA DE LOS RESULTADOS**

*«Ves las cosas que pasan y preguntas ¿por qué?, sueñas cosas que nunca fueron y dices ¿por qué no?»* George Bernard Shaw.

## **4. DISCUSION**

### **4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL: SELECCION DEL MODELO**

El presente trabajo fue desarrollado con el objetivo de investigar los cambios neuroquímicos en el SNC producidos por el actividad funcional luego de un comportamiento motor específico, el entrenamiento circular. Para ello, fue escogido el TEC como principal factor generador de la actividad física. Por las características del test, la actividad en este paradigma comportamental incluyó un componente motor, un componente de aprendizaje, subdividible en aprendizaje motor y aprendizaje asociativo y, finalmente, un tercer componente, el motivacional. Luego se utilizó un esquema alternativo para inducir el comportamiento motor, el TDG, diseño que permitió evaluar los cambios neuroquímicos relacionados con la variables motoras sin presentar el componente de aprendizaje asociativo ni las mismas características motivacionales del TEC.

Una vez inducida la actividad funcional, fue seleccionado un área particular del SNC para los estudios neuroquímicos. La estructura escogida fue el cuerpo estriado por diversos motivos: (I) es un componente principal de la regulación nerviosa de la actividad motora, (II) desarrolla funciones relacionadas con el aprendizaje implícito y la respuesta motivacional, (III) su organización interna, aferencias y eferencias, como también sus características neuroquímicas ya fueron estudiadas en profundidad y la disposición de dicha información facilita la interpretación de los resultados neuroquímicos, (IV) es de fácil acceso, disección y estudio, (V) muchos cambios neuroquímicos relacionados con distintos aspectos del manipuleo del SNC han sido detectados en el cuerpo estriado y (VI) el cuerpo estriado es una estructura de alto interés debido a que está involucrado en distintos problemas de importancia científica (e.g. neuropatologías, efectos de fármacos y drogas de abuso, plasticidad, motivación, memoria y aprendizaje).

Dada la alta integración entre distintas áreas del SNC, y máxime teniendo en cuenta que la actividad inducida genera una respuesta compleja, el estudio sobre el cuerpo estriado fue complementado con la evaluación de otras estructuras vinculadas con la actividad generada.

Los parámetros neuroquímicos de la actividad funcional fueron evaluados desde dos perspectivas diferentes: los efectos a largo plazo y los efectos inmediatos. Una vez más, se seleccionó una variable principal de estudio. En este caso fue el receptor colinérgico muscarínico. Entre las razones para esta elección se puede nombrar que: (I) el sistema colinérgico en el cuerpo estriado es un factor modulador importante, (II) en esta estructura presenta la mayor concentración del cerebro, además de hallarse ampliamente distribuido entre las distintas poblaciones neuronales del cuerpo estriado, (III) existen 5 subtipos diferentes, todos presentes en el cuerpo estriado, lo que indica una gran capacidad plástica, (IV) para los distintos subtipos se conoce con bastante profundidad las señales acopladas, efectos de su estimulación o bloqueo, distribución y otras características de interés, (V) el sistema colinérgico, tanto en el cuerpo estriado como en el resto del SNC, es considerado un sistema regulatorio con intervención en distintos procesos fisiológicos normales (aprendizaje, motivación, memoria, regulación motora) y patológicos (enfermedades neurodegenerativas).

También desde el aspecto molecular, dada la alta correlación entre distintos factores involucrados en la actividad del SNC, los estudios sobre el mAChR fueron complementados con el de otras variables neuroquímicas relacionadas.

El presente trabajo experimental puede dividirse en 3 etapas: (I) estudios de los efectos a largo plazo del TEC sobre el mAChR y otros componentes, (II) un análisis similar luego del TDG, (III) estudio de los cambios inmediatos en el TEC.

## **4.2. DEMOSTRACION DE UN PERIODO CRITICO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL CUERPO ESTRIADO**

### **4.2.1. El TEC produce una caída del mAChR si se entrena a los 30 días de edad**

La primera parte de este trabajo, que fue realizada con el empleo del TEC y estudiando los cambios permanentes, permite obtener diversas conclusiones de los aspectos neuroquímicos de la plasticidad motora. El entrenamiento en el TEC, demuestra que la actividad funcional puede generar cambios en el mAChR cuando los animales son entrenados a partir de los 30 días de edad durante 7 días. Los resultados experimentales comprueban que la actividad funcional en el TEC produce una caída de aproximadamente 35% en la densidad del mAChR en el cuerpo estriado cuando se comparan los animales machos entrenados con los controles machos sin entrenar. Las hembras, por otra parte, también muestran una caída pero esta es menor, cerca del 20%. Estos cambios sólo estuvieron relacionados con una variación del B<sub>máx</sub> del receptor, mientras que la afinidad del receptor fue similar en los distintos grupos experimentales.

Cabe aclarar aquí, y esto es válido para análisis posteriores, que el efecto del TEC sobre el mAChR puede estar asociado a: la actividad motora, el aprendizaje motor, el aprendizaje asociativo, el factor motivacional o a una combinación de dos o más de estas variables. Si bien hasta el momento nunca se relacionó al cuerpo estriado con el aprendizaje asociativo, también es cierto que los mecanismos de aprendizaje en el SNC no están completamente descifrados. De hecho, el descubrimiento que el cuerpo estriado participa en el aprendizaje implícito cambió la visión sobre esta estructura, la cual se creía hasta ese momento que sólo cumplía funciones secundarias para la corteza y relacionadas con el control del movimiento.

La relación entre los cambios neuroquímicos y la actividad motora resulta una idea atractiva. En particular porque la actividad neuronal mediada por neuroreceptores determina el patrón de conectividad sináptica (83, 101, 272), y de este modo resulta un factor altamente relacionado con la posibilidad de producir cambios neuroquímicos. No

obstante, existen también evidencias de que el aprendizaje puede producir cambios permanentes en la densidad de receptores (139). Del mismo modo, el bloqueo de la actividad colinérgica esta vinculada con una alteración del aprendizaje asociativo (23, 39, 309). De todas maneras, hay que mencionar que el diseño experimental en el TEC no permite excluir ninguna de las variables antes mencionadas como factores generadores de la alteración en el mAChR.

Un primer punto de interés fue certificar que estos cambios estaban relacionados con el entrenamiento *per se* y no con el estrés hídrico producido durante el test. Se debe considerar que el estrés hídrico conduce a un deterioro en la alimentación, a pesar de que todos los animales tuvieron comida ad libitum. De hecho se observa una caída en el peso de los animales durante la etapa de entrenamiento por la falta de agua. Distintas investigaciones han demostrado la privación de agua o comida puede producir cambios neuroquímicos permanentes en las estructuras nerviosas. En los experimentos descritos, la caída del peso fue similar en los animales entrenados y en los controles, que también fueron sometidos a estrés hídrico. Por otra parte, en la determinación del mAChR, los animales que no fueron entrenados ni privados de agua mostraron los mismos niveles que los controles privados. De esta manera, la caída del mAChR esta relacionada con la actividad directa en el TEC y no con la privación de agua o la caída del peso.

Un segundo análisis contempló el hecho de que el TEC representa una actividad giratoria, que equivale a una respuesta motora asimétrica. Por lo tanto, el cuerpo estriado derecho e izquierdo podrían presentar respuestas diferenciales, ya que la actividad en cada una de las mencionadas estructuras podría presentar diferencias cuantitativas o cualitativas para diversos parámetros neuroquímicos. Además, independientemente de la ejecución del test, podrían encontrarse asimetrías preexistentes entre ambas estructuras. De hecho, existen diversos informes en la literatura científica donde se observa características neuroquímicas asimétricas entre el

cuerpo estriado izquierdo y derecho. Dichas observaciones fueron realizadas sobre el sistema dopaminérgico (98, 138, 276). Por ello, esta posibilidad debe ser tenida en cuenta, aunque otros investigadores no confirmaron los primeros descubrimientos sobre las asimetrías neuroquímicas mencionadas (137, 222). En este trabajo, se observó que los niveles basales del mAChR y la caída luego del entrenamiento mostraron niveles similares en ambos lados. Tampoco se detectaron diferencias de lateralidad en el TEC entrenando los animales en un sentido o en el otro.

#### **4.2.2. La respuesta no es igual entre los dos sexos**

Aunque el entrenamiento muestra una caída en el mAChR para ambos sexos, existe una diferencia significativa en la respuesta de machos y hembras. Si bien esta diferencia no era esperada, el hallazgo no resulta sorprendente. Las diferencias hormonales, por ejemplo, pueden ejercer un efecto particular sobre el SNC de los distintos sexos. Uno de los casos conocidos es el efecto del estradiol, el cual influye sobre las neuronas colinérgicas del SNC a través de receptores de estrógeno (RE) (293). Aunque el cuerpo estriado no presenta RE, el estradiol tiene acción sobre esta estructura y afecta la actividad motora por mecanismos aún desconocidos. Entre las observaciones a este respecto, pudo comprobarse que el estradiol afecta la respuesta de los receptores dopaminérgicos estriatales (18, 265) y también modifica la actividad de las interneuronas colinérgicas (73). Además, la administración de estradiol aumenta los parámetros motores en animales entrenados en ruedas giratorias y en un modelo de rotación (133, 264). Por lo tanto, aunque no puedan definirse los procesos moleculares particulares que llevan a la observación de un cambio neuroquímico diferencial entre ambos sexos en el presente trabajo, las evidencias comportamentales y bioquímicas sugieren que las diferencias hormonales pueden modificar la respuesta comportamental y alterar cualitativa o cuantitativamente los cambios neuroquímicos luego de la actividad funcional.

Desde el aspecto comportamental, la evaluación de los parámetros motores y de aprendizaje en el TEC demuestran que tanto las ratas machos como las hembras



realizan una actividad similar en el test. Sin embargo, el rendimiento de las hembras presenta una mayor dispersión y existen más casos de exclusión de animales de este sexo por incumplimiento de las consignas. Esta mayor dispersión en las hembras es bastante común, a juzgar por los resultados obtenidos con numerosas pruebas conductuales.

#### **4.2.3. La respuesta es proporcional a los metros recorridos durante el ejercicio**

La primera detección de cambios en el mAChR fue realizada luego de entrenar a los animales durante 7 sesiones consecutivas. Por ello, uno de los objetivos consecuentes a este descubrimiento era saber si dichos cambios estaban relacionados con la magnitud del entrenamiento. Este concepto fue evaluado desde dos perspectivas.

En primer lugar se analizó para cada animal entrenado durante 7 días la correlación entre la caída del mAChR y dos componentes motores, la Vm y la cantidad de metros recorridos. En segundo lugar el cambio neuroquímico fue comparado con el número de errores acumulados durante el aprendizaje en el TEC.

Este análisis permitió concluir que el aprendizaje asociativo, al menos evaluados en función de EA, no muestra una correlación con los cambios observados sobre el mAChR. Por el otro lado, los cambios motores mostraron una asociación mucho más fuerte. En realidad, la caída del mAChR está altamente asociada a la cantidad de metros recorridos. Puede decirse entonces, que cuanto mayor fue el tiempo durante el cual los animales realizaron el ejercicio físico, mayor fue la caída de los niveles del receptor. Sin embargo, la segunda variable motora, Vm, no muestra una correlación tan estrecha. De acuerdo a este resultado, parecería que la intensidad y la cantidad de actividad motora ejercen un efecto diferente.

Se puede deducir que dichas variables no representan un indicador común en este modelo y que su influencia debe ser evaluada en forma independiente. También hay que considerar que los experimentos de Yamamoto y Freed (321) demostraron que se necesita alcanzar una determinada intensidad de giro para disparar cambios

neuroquímicos (1 vuelta/min durante 20 min). Estos valores se obtienen prácticamente desde el primer día de entrenamiento en el TEC. Es posible que la intensidad, sea un factor necesario pero que, una vez alcanzado un umbral, los cambios neuroquímicos sean mayores o menores en función del tiempo en que los mecanismos intervinientes se encuentran activos y no de la velocidad de giro, o la intensidad con la cual dichos mecanismos participan. De todos modos, la interpretación de esta última variable debe considerar que se hace sobre los valores promedios de la misma. Como se explicó anteriormente, en el TEC la velocidad de giro puede verse distorsionada por dos razones. En primer lugar porque en animal en realidad utiliza su tiempo corriendo intensamente hasta el sitio de la recompensa y luego para tomar el agua, utiliza una cantidad de tiempo similar al empleado en dar la vuelta. Por otro lado, la velocidad de giro promedio de una sesión, no permite discernir si el animal corrió más rápidamente durante un período y más lento en otro o si la velocidad de giro fue homogénea a lo largo de toda la sesión. Claramente, entonces, la intensidad de giro real del animal se puede ver distorsionada por estos factores, por lo que la  $V_m$  en ciertos casos puede ser un parámetro fiel y en otros no. Con lo cual la falta de correlación puede estar relacionada con estas causas.

Por último, se evaluó sobre estos datos la diferencia de respuesta entre machos y hembras por separado. Se observa que si bien los dos grupos presentan una correlación similar, la dispersión es mayor en las hembras y los efectos son más evidentes en los machos. Esta observación, es congruente con los resultados descritos anteriormente donde se diferencia la respuesta comportamental entre los dos sexos.

#### **4.2.4. El cambio es permanente**

A continuación se analizó la duración de los cambios observados en el mAChR por el entrenamiento iniciado a los 30 días. La caída, tanto en machos como en hembras, se mantuvo inalterada hasta inclusive un año después de terminado el entrenamiento.

Claramente, y considerando la expectativa de vida de una rata, estos cambios pueden ser considerados como alteraciones permanentes.

#### **4.2.5. Existe un período crítico limitado para que se produzcan los cambios**

Otro dato distintivo de la caída del mAChR luego del TEC es que esta variación es particular de un período determinado del desarrollo postnatal. El entrenamiento a los 30 días, como se indicó, produce una caída del mAChR. Sin embargo, el entrenamiento inmediatamente antes (a partir de los 20 días) o después (40, 60 ó 90 días) no genera consecuencias similares sobre los niveles del mAChR. Este hallazgo, indica claramente la presencia de un período crítico limitado donde los cambios permanentes pueden producirse por estimulación funcional. Dicha observación muestra que la plasticidad motora en esta estructura cerebral, presenta una alta similitud, en cuanto a esta característica, con la plasticidad del sistema visual descrita por Hubel y Wiesel (311). Sin embargo, en este caso, se observa que el período de sensibilidad es mucho más limitado. Aunque no fue estrictamente definido, dado que a los entrenamientos iniciados a los 20 y 40 días no los producen, podría afirmarse que este período crítico se prolonga por menos de 20 días. Por el contrario, en el sistema visual el período crítico perdura alrededor de 50 días (66). El período crítico del sistema visual, además, presenta una aparición y desaparición gradual no sólo temporal sino también en intensidad, mientras que en el descrito aquí, no ha sido evaluada esta propiedad.

La presencia de un período crítico en el cuerpo estriado debería estar correlacionado con diferencias concretas entre esta etapa del desarrollo y los períodos precedentes y posteriores. Ciertamente, deben existir factores presentes a los 30 días que permitan el cambio en el mAChR. Estos mismos factores deberían estar ausentes en las otras edades o al menos neutralizados. Alternativamente, se puede pensar que existen factores cuya presencia evitan que los cambios se produzcan y que sólo a los 30 días se encuentran ausentes o compensados. Cualquiera sea la respuesta, la determinación de las causas resulta una difícil tarea ya que podría estar relacionados con una serie compleja de

eventos, tanto internos de la estructura en estudio como propios de otras áreas nerviosas que interaccionan y modulan la función del cuerpo estriado.

Los cambios neuroquímicos no se detectan a los 20 días ni más allá de los 40 días. Es probable que la ausencia de efectos perdurables en ambas circunstancias sean distintas. La falta de un cambio plástico permanente a los 20 días puede involucrar la relativa inmadurez de la estructura en ese momento. A partir de los 40 días, en cambio, las causas podrían ser otras muy distintas. Esta hipótesis está sustentada en varios hechos. Los parámetros neuroquímicos básicos del sistema colinérgico-dopaminérgico del cuerpo estriado maduran en forma temprana y ya presentan niveles importantes a los 20 días de edad. Sin embargo, la actividad de tirosina-hidroxilasa, la concentración de dopamina y la recaptación de alta afinidad de dicho neurotransmisor, continúan creciendo más allá de los 20 días y recién alcanzan el 75% de los niveles adultos en la 4ª semana postnatal (49). Por otra parte, varios sistemas de neuropéptidos maduran en forma posterior, modulados por la actividad funcional de los sistemas de neurotransmisión clásicos, y representan una segunda etapa del desarrollo neuroquímico del estriado (240, 286). Como la maduración neuropeptidérgica incide en las características funcionales de la neurotransmisión, la falta de un adecuado desarrollo de estos sistemas podría ser una razón por la cual el TEC no puede generar los estímulos suficientes para producir cambios permanentes a los 20 días.

Por otra parte, a los 30 días el sistema estriatal presenta características neuroquímicas muy diferentes a las encontradas 10 días antes. Estudios ontogénicos muestran en esta etapa, una tendencia a la estabilización en los parámetros relacionados con la neurotransmisión colinérgica luego de haber alcanzado sus niveles máximos. En este momento, entonces, se estabiliza la conducción colinérgica (y posiblemente otras) luego de la maduración de distintos aspectos neuroquímicos de la estructura estriatal. Es allí donde se produce, con el TEC, un aumento «anormal» de la actividad funcional

del sistema. La influencia de dicha estimulación sobre las conexiones neuronales es muy diferente ahora, pues la madurez de las sinapsis es distinta.

Desde el punto de vista del mantenimiento de las sinapsis por factores trófico, el NGF puede desempeñar un papel importante en estos cambios es el NGF. El estudio ontogénico demuestra que, en cuerpo estriado, sus niveles decaen fuertemente alrededor del día 30 postnatal y vuelven a subir posteriormente (206). El NGF cumple un rol fundamental en la supervivencia de las neuronas (110). También es muy importante para la regulación del sistema colinérgico. En cuerpo estriado, por ejemplo, la administración de NGF evita la caída de los niveles de CAT provocada por la aplicación de ácido quinolínico (300). Precisamente, el ácido quinolínico es un antagonista glutamatérgico que afecta la conectividad y sobrevivencia de las interneuronas estriatales y en menor medida a las neuronas proyectivas (76), mientras que el NGF representa un factor protector de estos cambios. En otro modelo animal de ratas adultas sometidas a desvascularización de la corteza cerebral, el NGF recupera el número de mAChR (182) y produce sinaptogénesis e hipertrofia cortical (86). Resulta interesante observar que el período de sensibilidad comprobado en este trabajo coincide con un período de disminución fisiológica de los niveles del NGF y que por lo tanto representa una etapa donde las neuronas estriatales se encuentran especialmente susceptibles a los efectos de la activación del receptor de NMDA. En relación a este efecto, otra línea experimental en nuestro laboratorio, demostró que la administración de NGF puede producir cambios en este modelo (315). La administración del mencionado factor trófico durante el período de 30 a 37 días postnatal da lugar a que los cambios permanentes del mAChR en entrenamiento realizados a partir de los 40 días de edad, mientras que los animales que fueron entrenados pero no recibieron NGF no muestran cambios. Todos estos resultados, en conjunto, permiten vincular a los factores tróficos con la presencia de una ventana de sensibilidad para la generación de los cambios permanentes.

Luego del período de sensibilidad descrito, el entrenamiento a partir de los 40 días de edad no produce modificaciones. Nuevamente, en el campo de las hipótesis, es razonable pensar que el estado neuroquímico y fisiológico del cuerpo estriado a partir de dicha edad ya no permite que la estimulación motora modifique los niveles de receptores. Sin poder determinar, las causas precisas que ocasionan esta conducta queda claro que a medida que el SNC madura distintos eventos plásticos comienzan a ser restringidos y este, posiblemente, sea un ejemplo de ello. El progreso de la gliogénesis, los cambios en los factores neurotróficos y otras tantas variables modifican las características plásticas del sistema.

#### **4.2.6. Reducción de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 pero no del NMDA**

El papel modulador y la alta integración de procesos neuroquímicos en el cuerpo estriado hace suponer que difícilmente el cambio en el mAChR sea un hecho aislado. De hecho puede ser el inicio, el final o un paso intermedio en una cadena de cambios originados por el TEC. Dada la importancia de la integración de los distintos sistemas de neurotransmisión para posibilitar el papel funcional del cuerpo estriado, resulta claro que la búsqueda de nuevos parámetros neuroquímicos alterados debía incluir el análisis de otros neuroreceptores. Por ello, en el presente trabajo se evaluaron distintos neuroreceptores que mantienen un equilibrio funcional con el mAChR en el cuerpo estriado. Ellos son el receptor glutamatérgico tipo NMDA y el dopaminérgico D1 y D2. El análisis de estas moléculas demostró que sólo el sistema dopaminérgico, tanto el D1 como el D2 presenta alteraciones.

Estos resultados permiten distintas conclusiones. Por un lado, demuestran que el cambio no es específico del mAChR pero que tampoco responde a una variación general, dado que otros receptores importantes no muestran modificaciones. El receptor dopaminérgico D2 presenta una caída de su densidad (alrededor de 40%) altamente correlacionada con la variación en el mAChR. El receptor D1, por otra parte, experimenta una caída menor pero sustancial, de aproximadamente 20%. De esta manera el sistema colinérgico-dopaminérgico muestra una variación similar. Este

comportamiento simultáneo puede explicarse por la alta correlación de ambos sistemas en el estriado. En primer lugar la maduración de ambos sistemas muestran una evolución paralela durante el desarrollo nigroestriatal (257). En segundo lugar, la fibras dopaminérgicas nigroestriatales presentan un patrón de distribución similar al de las conexiones colinérgicas estriatales sobre las neuronas gabaérgicas del cuerpo estriado (90, 233). Inclusive, se ha demostrado, en algunos casos, la expresión simultánea de receptores dopaminérgicos y muscarínicos en el mismo sector dendrítico (62). De esta manera, la distribución de ambas moléculas evidencia el alto grado de interrelación funcional entre ambos sistemas. La interacción entre los sistemas colinérgicos y dopaminérgicos resulta un punto central en los estudios farmacológicos de los ganglios basales, del mismo modo que el balance entre los niveles de acetilcolina y dopamina parecen ser importantes para el funcionamiento normal del cuerpo estriado (173). Por lo tanto, una modificación conjunta resulta razonable. De hecho, se ha descrito en humanos la caída correlacionada del mAChR y el receptor dopaminérgico D2 en pacientes con Parkinson (2).

A parte de estos eventos iniciales, evidentemente, la estabilización de las alteraciones encontradas en el mAChR, el D1 y el D2, que involucra tanto a las neuronas gabaérgicas proyectivas como al sistema colinérgico-dopaminérgico, debe incluir otros procesos neuroquímicos como la generación de señales intracelulares, cambios del patrón de expresión genética y participación de factores tróficos.

#### **4.2.7. Posibles eventos en la reducción del número de neuroreceptores**

Por la magnitud de los cambios y la distribución tisular de los receptores involucrados, la atención fue dirigida hacia las neuronas gabaérgicas, las cuales representan más del 90% de las neuronas del cuerpo estriado y expresan, tanto al mAChR como a los receptores dopaminérgicos.

Más allá de la comprobación de que el TEC genera las alteraciones neuroquímicas mencionadas, quedan varias preguntas por responder. Entre ellas cuál es la causa de

este cambio. Las posibilidades son varias: (I) el número de receptores decrece por la disminución del número de neuronas, (II) disminuye por la reducción del número de sinapsis o (III) tanto el número de neuronas como el de de sinapsis permanece constante, pero decrece la densidad en membrana de cada receptor. La respuesta también podría ser una combinación de estas tres hipótesis. Esta pregunta no tiene una resolución fácil a partir de la metodología empleada en el trabajo. De todos modos pueden realizarse algunas consideraciones.

**Hipótesis de muerte neuronal:** En primer lugar, existe la posibilidad de que la actividad en el TEC produzca o estimule la muerte neuronal y que esta sea la causa de la disminución en el número de receptores. En el cuerpo estriado, el período de muerte celular programada se encuentra prenatalmente determinado, aunque también puede observarse en los primeros días de desarrollo postnatal (228). Si bien para el momento del entrenamiento los eventos importantes de muerte celular ya han quedado atrás, es posible que la sobreestimulación afecte neuronas aún sensibles. En este sentido, la actividad del receptor glutamatérgico tipo NMDA ha demostrado un rol excitotóxico (244). El cuerpo estriado presenta una alta concentración de este receptor en las mismas poblaciones celulares que expresan el receptor dopaminérgico y el mAChR. El ácido caínico, un análogo del glutamato, actuando sobre los receptores de NMDA produce daño neuronal en el SNC seguido, luego de unas horas, por un aumento en la expresión de la proteína p53, molécula que interviene en los procesos de muerte celular programada (270). Además, no se puede descartar que se produzcan procesos de muerte celular por otros mecanismos independientes de la hiperactividad del receptor de NMDA. Un factor que debe ser tenido en cuenta es la mayor vulnerabilidad relativa de las neuronas colinérgicas (319). De hecho, se ven afectadas en diversos trastornos neurodegenerativos. La muerte de interneuronas colinérgicas en el cuerpo estriado podría generar un cambio en los niveles de receptores. Estas neurona expresan, en forma presináptica, el subtipo m2 que representa un porcentaje muy bajo del total de mAChR. Además, las interneuronas colinérgicas son, a la vez, una población menor del



total neuronal. De esta manera, la reducción en su número no explicaría el cambio observado en el mAChR. Además, la desaparición de estas neuronas moduladoras supondría, al menos en forma teórica, un evento muy importante desde el punto de vista funcional. Una reducción del número de neuronas gabaérgica podría ser asimilada por el cuerpo estriado con menores consecuencias funcionales. Es precisamente esta población neuronal, la que contiene el mayor porcentaje de mAChR (subtipos m1 y m4). De todas maneras, resulta poco probable que si se produjera una muerte poblacional de alrededor del 35-40% (a juzgar por la disminución de receptores), esta variación no fuera acompañada por un descenso al menos parcial de los receptores de NMDA que también están presentes en la misma población neuronal.

***Reorganización de las conexiones sinápticas:*** Otra hipótesis a considerar es que la caída de los receptores esté relacionada con una disminución de la arborización dendrítica y de las sinapsis. Una vez más, la actividad glutamatérgica de la corteza podría explicar este mecanismo. La activación del receptor de NMDA provoca el refinamiento de proyecciones nerviosas en distintos sistemas, principalmente el visual. En el tálamo, el bloqueo del receptor de NMDA impide la segregación en subcapas de las aferencias retinogénicas (120). Simons y sus colegas demostraron que el receptor de NMDA es necesario para el refinamiento topográfico de las proyecciones retinoculares. La actividad glutamatérgica elimina largas porciones de axones y reduce la arborización dendrítica (284). Además, los receptores de NMDA refinan las conexiones talámicas durante el período crítico de plasticidad visual (81). Por último, también en el modelo de plasticidad de la corteza somatosensorial, el bloqueo del receptor de NMDA interfiere con el remodelamiento de las conexiones luego de la remoción experimental de los bigotes (275). En el cuerpo estriado, la activación del receptor de NMDA podría estar jugando un rol similar. Como en el caso de la muerte celular, cabría hacerse la misma pregunta ¿por qué si se produce una reducción de las sinapsis, y de esta manera se afecta el número de mAChR y de receptores D1 y D2, no disminuye el número de receptores de NMDA? En el caso anterior, la falta de una

explicación congruente parecía excluir la posibilidad. No obstante, aquí, existe una explicación que la sostiene. La actividad glutamatérgica sobre las neuronas gabaérgicas podría debilitar la sinapsis con los axones colinérgicos y dopaminérgicos pero sin alterar la conexión con las fibras corticales que se produce en otro área del árbol dendrítico. La conexión sináptica de la fibra cortical aferente se encuentra físicamente separada de las conexiones de las fibras colinérgicas y dopaminérgicas. Por lo tanto, la eliminación de estos contactos, con la consecuente desaparición o disminución de los receptores involucrados, podría producirse sin afectar la conexión glutamatérgica sobre la misma neurona.

Esta explicación de los cambios neuroquímicos hallados en el presente trabajo es coherente con la reciente evaluación realizada por Singer sobre los procesos plásticos corticales durante el desarrollo (285). En primer lugar, sostiene el mencionado investigador, la arquitectura básica y las conexiones de la corteza se establecen en base a un programa predeterminado que no requiere de la experiencia. Luego, la maduración de las conexiones y la reorganización de los circuitos se establece, en base a la actividad dependiente de la experiencia, y teniendo como efector principal de estos cambios, las neuronas moduladoras. Este evento se produce en un período limitado durante el desarrollo, donde la remodelación permite cambios importantes del patrón de conectividad. Terminado dicho período morfogenético donde la experiencia puede producir cambios profundos, el sistema «cristaliza» y parece perder su capacidad de desarrollar «cambios dependientes del uso». Deja de ofrecer, así, la misma sensibilidad aunque el sistema nervioso mantiene otros tipos de características plásticas.

***Reducción de la densidad del receptor en la sinapsis:*** En tercer lugar, podría suceder que el patrón de conectividad se mantenga relativamente inalterado y la densidad de los receptores en cada sinapsis disminuya. De producirse este evento, también parece posible que los mecanismos intracelulares que regulan la disminución de un sistema (e.g. muscarínico) sean los mismos que regulan al otro (e.g. dopaminérgico) o estén

altamente correlacionados. La disminución de los niveles de AchE no alcanzan a despejar la duda. Podría suceder que la producción de AchE también sea menor porque su niveles mantienen una cierta correlación con la densidad de otros parámetros colinérgicos (enzimas sintetizadoras de acetilcolina, niveles de acetilcolina y receptores) expuestos en la sinapsis. O bien puede ser que la disminución de la AchE responda a la reducción de sinapsis colinérgicas, el caso anteriormente hipotetizado. Sea cual fuera la causa, queda claro que el cambio del receptor muscarínico también modifica en parte otros elementos de la neurotransmisión colinérgica.

De acuerdo con esta última hipótesis, es posible que nos encontremos frente a un período de consolidación neuroquímica final de algunos parámetros involucrados en la neurotransmisión y funcionalidad de la estructura nerviosa. Este período se produciría luego de la conformación temprana de las conexiones entre estructuras, de la formación de las conexiones neuronales internas y de la estabilización de los sistemas de neurotransmisión. La maduración de los sistemas peptidérgicos, por ejemplo, se produce en forma tardía, precisamente en el período analizado y participa, posiblemente, en la conformación final de la estructura neuroquímica básica del sistema. Uno de los pasos de esta maduración final podría ser el establecimiento de los niveles adecuados de neuroreceptores en las sinapsis nerviosas. Continuando con esta argumentación, es posible pensar que las neuronas exponen inicialmente un número de neuroreceptores mayor al necesario, cantidad que luego se modificaría a partir de la actividad funcional y la «necesidad fisiológica». Posiblemente para dicho comportamiento exista un período determinado, luego del cual los niveles normales quedarían establecidos. Tal período sería un período crítico, ya que la interferencia de este proceso podría conducir a la exposición de niveles «anormales» de receptores en sus sinapsis.

El SNC da diversos ejemplos del empleo de un mecanismo similar. El cerebro, por ejemplo, nace con un número mucho mayor de neuronas, de las que el individuo empleará en su actividad postnatal. El excedente celular es eliminado a partir de la

actividad funcional, las neuronas que no se conectan adecuadamente mueren. Del mismo modo, las células nerviosas, generan numerosas conexiones, un patrón de conectividad que luego es refinado, también mediante la actividad funcional.

La perspectiva farmacológica puede aportar información valiosa para este análisis. Es conocido que la administración crónica puede producir cambios plásticos en los niveles de receptores. La falta de recepción del neurotransmisor induce a la célula a aumentar sus niveles de receptor y viceversa, fenómenos que se conocen como desensitización e hipersensibilización. Suspendido el tratamiento farmacológico, la neurona suele volver a expresar sus niveles «normales» de receptor. Esto quiere decir que la célula reconoce un nivel basal y la pregunta es cómo y cuándo lo determina. Es posible que parte de esa regulación tenga un componente genético. Pero como el desarrollo de varios aspectos del SNC lo demuestra, en este sistema se combinan los factores genéticos y ambientales para desarrollar una mayor adaptación funcional. Por lo tanto, siguiendo la línea de análisis establecida en esta sección, es posible que la determinación de los niveles «normales» de receptores se produzca, al menos en parte, desde un punto de vista funcional no programado. De ser este el caso, suponiendo que las neuronas establecen en algún momento los niveles normales de receptores, también es factible esperar que lo hagan en función de la actividad en la que deban intervenir y que esto se determine luego de la maduración al menos parcial de la estructura en cuestión. Por lo tanto, podría ser cierto que ciertas neuronas del cuerpo estriado, luego de distintos pasos de maduración neuroquímica, se encuentren en condiciones de determinar sus niveles «normales» de receptor colinérgico muscarínico en el mismo momento en que se genera una actividad funcional exagerada. Luego de 3 horas de entrenamiento a lo largo de 7 días, cada animal recorre aproximadamente 1 km, actividad de ningún modo comparable con el comportamiento motor dentro de una jaula. Las neuronas del cuerpo estriado están recibiendo una estimulación glutamatérgica desmesurada. Si en ese período debe decidir la nivelación de algunos de sus sistemas de neurotransmisión considerando que esa estimulación corresponde a la actividad «normal» del sistema,

evidentemente los resultados van a ser distintos a los observados en los animales no entrenados.

Una posible explicación involucra al receptor NMDA que, como en otros circuitos nerviosos, a través de la participación en procesos de LTP y LTD, podría modificar el patrón de conectividad nerviosa (285). La estimulación glutamatérgica cortical puede actuar no sólo sobre las neuronas gabaérgicas sino también sobre las interneuronas colinérgicas, ya que ambas poblaciones expresan el receptor NMDA (169). A su vez, la estimulación colinérgica puede generar cambios sobre las neuronas gabaérgicas proyectivas. De hecho, Honda y colaboradores demostraron que la administración de oxotremorina, agonista muscarínico, en el estriado produce una reducción en el mAChR de alrededor del 44% (129). Este efecto puede verse acompañado por cambios más profundos dado que conjuntamente con la caída del mAChR, los investigadores observan un aumento de 1.5 veces en la incorporación de leucina tritiada por las células estriatales, lo que indica una posible alteración de la síntesis protéica. También en la médula espinal, se observó una caída del mAChR por estimulación de agonistas *in vivo* (290). Como otros neuroreceptores, el mAChR disminuye luego de la exposición a agonistas y de este modo el sistema regula la sensibilidad en respuesta a variaciones en los niveles de actividad fisiológica *in vivo*. La regulación del mAChR por el efecto de agonistas es un proceso que ha sido estudiado en modelos *in vitro*. La disminución del número de mAChR requiere horas, a diferencia de la desensitización que ocurre en minutos y que responde a cambios de la afinidad y no a una caída en el número de receptores (289). Por otra parte, en células normales, la vida media aparente del mAChR es de alrededor de 3 horas (154). Luego de la remoción de un agonista, se reestablece gradualmente el número de receptores, recuperación que puede evitarse por inhibición de la síntesis protéica o de la glicosilación (154, 185, 289). Galper y colaboradores estudiaron el efecto de la estimulación del mAChR en células intactas del corazón con dos ligandos distintos, el QNB y NMS (85). El QNB, un ligando lipofílico, permitía detectar el mAChR en la preparación celular completa ya que era capaz de penetrar

dentro de la célula, mientras que la NMS, lipofóbica, sólo detectaba el mAChR de la superficie. Esta metodología de estudio permitió descubrir que, luego de la estimulación por agonista, el mAChR se internalizaba rápidamente, caía la unión de la NMS, pero la pérdida de la unión al QNB (la degradación) se producía en forma más lenta. La internalización, representaba un cambio rápido, reversible y sensible a la temperatura (75, 194). Mientras que una vez degradado el mAChR, la recuperación de los niveles anteriores llevaba horas. La conversión, inducida por agonista, del mAChR a una forma no accesible al NMS fue acompañada por una alteración subcelular, de la membrana plasmática a vesículas más livianas en gradientes de sacarosa (122).

Además de la respuesta directa a agonistas, el mAChR puede ser modificado por la actividad neuronal. Estos cambios pueden tanto aumentar como disminuir la densidad. Experimentos *in vitro* demuestran que la actividad eléctrica puede aumentar hasta un 100% el número de mAChR en un lapso de 12 hs y que este fenómeno se debe a una disminución de la velocidad de degradación (212), mientras que experimentos *in vivo* en ratones permiten observar el efecto contrario, la actividad disminuye el número de receptores (285). El proceso descrito en este trabajo puede responder a estos mecanismos. Por lo general, la estimulación transitoria del mAChR produciría una regulación hacia abajo y una recuperación rápida. La participación de fenómenos de degradación podría ser la causa de una estabilización a niveles más bajos en las sinapsis, luego del entrenamiento motor en el período de sensibilidad a los cambios permanentes. Del mismo modo, otros procesos podrían desempeñar un papel complementario actuando, a nivel intracelular, tanto sobre la regulación del número como sobre la expresión del ARNm.

Si bien esta hipótesis no puede ser comprobada con los resultados experimentales del presente trabajo, la posibilidad de que exista un período de sensibilidad en el cual los niveles de neuroreceptores puedan ser modificados en forma dramática, está respaldada por las conclusiones de algunas investigaciones farmacológicas. Precisamente, existen

ejemplos de cambios permanentes en los niveles de receptores por manipulación de los sistemas de neurotransmisión. Miller y Friedhoff, por ejemplo, estudiaron en varios trabajos el efecto de la administración de neurolépticos sobre densidad de receptores (203, 204). Encontraron que la administración prenatal y postnatal de estos fármacos pueden producir cambios a largo plazo en los niveles del receptor dopaminérgico y colinérgico en el cuerpo estriado. Más aún encontraron que la posibilidad de interferir en estos sistemas se produce en un período limitado de tiempo, antes o luego del cual los cambios no son generados. Si bien existen algunas diferencias, también es llamativo el grado de similitud con los resultados aquí expuestos. En ambos casos la interferencia con un sistema de neurotransmisión produce cambios a largo plazo y el período de sensibilidad es limitado. Aunque los períodos no coinciden temporalmente, esto no invalida la explicación. Friedhoff y Miller utilizan una aproximación farmacológica, mientras que el modelo presentado en este trabajo utiliza una manipulación fisiológica. La ventana de sensibilidad en ambos casos no tienen que coincidir necesariamente. De todos modos, Friedhoff y Miller no identificaron si los cambios en su modelo respondían a una disminución en la densidad del receptor o a una reducción del grado de conectividad.

#### **4.2.8. Diferencias de los subtipos del mAChR en la transcripción**

Los estudios de expresión del mAChR tuvieron un doble objetivo. Por un lado, permitieron analizar si la caída de la unión del ligando, que representa un cambio a nivel de proteína, se ve correspondido por una alteración de los niveles de ARN del mAChR. Este cuestión resulta válida ya que otros investigadores hallaron que los cambios en los niveles de la proteína del mAChR no necesariamente están relacionados con cambios en el ARNm. Ogawa y colaboradores, comprobaron que la reducción del m1 relacionada con el envejecimiento no mostraba una disminución similar en los niveles de ARNm, indicando que las modificaciones del mAChR pueden deberse solamente a alteraciones de los eventos post-transcripcionales (226).

Por otro lado, la metodología de amplificación genética permite evaluar en forma independiente el efecto del entrenamiento sobre la transcripción de los distintos subtipos del mAChR, mientras que los resultados obtenidos por el ensayo de unión del  $^3\text{H}$ -QNB evaluaban el efecto sobre la población total del receptor. En el trabajo, se analizaron los subtipos M1 y M4 por ser los de mayor relevancia en el cuerpo estriado. En cuerpo estriado el M1 y M4 representan alrededor del 90% del total del mAChR y se encuentran en poblaciones diferentes. También hay que tener en cuenta que estos dos diferentes subtipos se encuentran expresados en poblaciones neuronales diferentes y asociados a distintos sistemas de transducción de señal.

La cuantificación del ARN mostró que en ambas estructuras existe una alteración de la expresión del mAChR luego del TEC, sin embargo las variaciones fueron marcadamente disímiles entre sí. Dado que los animales evaluados fueron sacrificados más de dos meses después de finalizado el entrenamiento, puede establecerse que los cambios detectados son de largo plazo.

Además, como ambos subtipos presentan concentraciones similares, la caída del receptor indicaría o una reducción similar de ambos o una caída mayor al 35% en uno mientras que el otro subtipo no se vería alterado. Esta interpretación sería válida siempre y cuando las variaciones en la expresión del ARNm y en la proteína estuvieron altamente correlacionada.

La caída del 50% en la expresión del M1 parece indicar *a priori* que la reducción de este subtipo es más preponderante. No obstante, los experimentos realizados no permiten comprobar que los cambios observados a nivel de la ARN se transformen, en forma directa, en variaciones de los niveles de la proteína que codifican. De hecho, la evaluación de los niveles del ARN del subtipo M4 demuestran un triplicación de los niveles de expresión en los animales entrenados.

A juzgar por los resultados de los ensayos de unión con  $^3\text{H}$ -QNB, esta aumento no se transforma en cambios a nivel sináptico ya que ser así la detección del mAChR debería aumentar considerablemente, aún en el caso que el M1 disminuya. Por ello, queda claro



que al menos para el M4, el sistema de transcripción y de traducción se encuentran desfasados.

La valoración también se puede realizar considerando la posibilidad de que el número de neuronas sea diferente entre los animales controles y entrenados. Si como consecuencia del entrenamiento, se produce una reducción del número de neuronas, en ese caso la valoración del aumento del subtipo M4 estaría subdimensionada, porque además de observarse un nivel mayor, son menos las neuronas que lo expresarían. Por el contrario, la reducción del subtipo M1 podría ser compatible con una disminución del número de células y no con una variación en los niveles de expresión.

Si consideramos en cambio que el entrenamiento circular podría generar una disminución de la densidad sináptica del mAChR, el análisis es distinto. Bajo esta hipótesis, los cambios en la expresión del subtipo M4 podrían representar una activación de ciertos mecanismos neuronal que, reconociendo dicha disminución, desencadenan un aumento de la transcripción del ARN. No obstante, la participación de otros mecanismos que, a nivel post-transcripcional, impidieran la traducción serían los responsables de la distorsión observada. Otras posibles explicaciones son que el ARNm sea traducido pero que el producto nunca llegue a exponerse a nivel sináptico o que que la proteína sintetizada no sea funcional. En realidad, otra posibilidad que antecedería en el tiempo a estos mecanismos es que la transcripción del ARN no se continúe con los procesos de maduración que permiten generar el ARNm. En este caso el gen del mAChR es transcrito pero su respectivo ARNm nunca llega a salir del núcleo. Dado que en la metodología de estudio, se utilizan secuencia intraexónicas para estudiar el ARN, no puede establecerse si la detección corresponde al ARN heterogéneo nuclear o al ARNm, con lo cual esta posibilidad no puede ser negada ni afirmada.

Más allá de las diferentes hipótesis posibles, es evidente que el efecto que el entrenamiento ejerce es diferente sobre aquellas neuronas gabaérgicas que proyectan al globo pálido (M1) y las que proyectan a la sustancia nigra (M4).

#### **4.2.9. Los cambios son particulares de estructuras motoras**

El hallazgo de cambios en el sistema colinérgico del cuerpo estriado estimuló el análisis del mismo sistema en otras áreas cerebrales. La razón de este estudio tiene dos orígenes. Por un lado, la compleja actividad funcional desplegada durante el entrenamiento permite suponer que otras áreas cerebrales pueden presentar una respuesta neuroquímica similar. Por otro parte, el sistema colinérgico representa un sistema regulador interno también en otras estructuras. De este modo, los cambios observados en el cuerpo estriado no tienen que representar, necesariamente, alteraciones específicas de esta única estructura. Con estas consideraciones, se analizó el efecto del entrenamiento en otras áreas cerebrales: corteza, amígdala, hipocampo y cerebelo. Las razones para incluir estas estructuras en el estudio fueron varias. La corteza motora fue evaluada en primer lugar por su función directa en el comportamiento motor y por su conexión con el cuerpo estriado. También se evaluaron la corteza frontal y la corteza occipital. El cerebelo fue seleccionado como una estructura que participa tanto en funciones relacionadas con el control del movimiento como en el aprendizaje motor (252, 271). El hipocampo, por su reconocida participación en el aprendizaje asociativo, aunque los cambios a largo plazo no representan, precisamente, la función característica de esta estructura en los mecanismos de memoria y aprendizaje. La amígdala fue incluida en el estudio por su papel en los mecanismos motivacionales (279), y su función moduladora de los procesos de aprendizaje y memoria del cuerpo estriado y del hipocampo (229).

Los estudios sobre el mAChR demostraron que el TEC no produce alteraciones del sistema colinérgico en la mayoría de las áreas evaluadas. Ni el hipocampo, ni el cerebelo, ni la amígdala mostraron variaciones en sus niveles de mAChR. Además de la reducción notoria en el cuerpo estriado (35%) el TEC produjo una disminución significativa pero menor (20%) en la densidad del mAChR en corteza motora. Los cambios observados en corteza motora no fueron extensivos a otras áreas corticales. La

cortezas frontal y occipital no mostraron modificaciones. Estos resultados indican que sólo las estructuras motoras presentan alteración de los receptores colinérgicos. Estas dos estructuras, corteza motora y cuerpo estriado, están fuertemente vinculadas además por el la interconexión corteza motora-cuerpo estriado-sustancia nigra-tálamo-corteza motora, lo que favorece la posible interacción. Aunque no puede decirse que la variación en el sistema colinérgico de ambas estructuras guarden una vinculación funcional directa. En las dos áreas, el sistema colinérgico representa un sistema intrínseco no proyectante, lo que hace pensar que los cambios obedecen a modulaciones internas que pueden o no estar correlacionadas con cambios en la funcionalidad y conectividad entre ambas estructuras. Una hipótesis atractiva es que el aumento de actividad funcional durante el TEC produzca una mayor actividad glutamatérgica sobre el cuerpo estriado, y que la modulación del sistema regulador colinérgico-dopaminérgico finalmente genere, mediante retroregulación, cambios del patrón de conectividad en la corteza motora, con la consiguiente modificación de la regulación colinérgica interno. De todos modos, aún en el caso de que los efectos observados en una de las dos estructuras afecte al sistema colinérgico de la otra, nada puede decirse acerca de cuál se produce primero. Inclusive, ambas modificaciones podrían producirse en forma simultánea. Claramente, son necesarios mayores estudios para determinar la relación entre las variaciones del sistema colinérgico estriatal y cortical motor, si es que existe.

#### **4.2.10. También disminuyen los niveles AchE y la detección de NF**

Los estudios a largo plazo también incluyeron el análisis de la AchE, así como la detección inmunohistoquímica de NF y GFAP.

En relación a la acetilcolinesterasa, los resultados demostraron que los animales entrenados presentan en promedio entre 25 y 30% menos AchE. Este valor, en realidad, presente una significatividad estadística baja. Dada relativa simpleza de la técnica cuantitativa utilizada, el alto grado de variabilidad en las mediciones no parece responder a dificultades técnicas sino mas bien a una consecuencia de la baja

correlación biológica entre este cambio y la caída del mAChR. Si bien la AchE esta estrechamente asociada al mAChR dado que interviene en la neurotransmisión colinérgica degradando a la acetilcolina, los procesos que se inician por la actividad funcional en el TEC no tienen que afectar en forma similar a estas dos variables.

Tanto en el caso de que exista muerte celular, como si los efectos del entrenamiento reducen el patrón de conectividad o la densidad del mAChR en la sinápsis, resulta razonable suponer que la AchE muestra una reducción también. Por ello, la determinación de una caída en los niveles de AchE no aporta información diferencial a este respecto pero respalda el concepto de que el sistema colinérgico es alterado por la actividad funcional.

Respecto a la detección de GFAP, los estudios inmunohistoquímicos no demuestran diferencias groseras en las imágenes de células gliales. De todos modos, la metodología empleada no permite descartar cambios más sutiles en esta población celular.

En cuanto a la inmunomarcación de NF, en cambio, las evidencias permiten comprobar que el entrenamiento ejerce un efecto importante. Las imágenes obtenidas demuestran una disminución en la detección de este marcador en los animales entrenados. Dado que los NF proveen de información acerca de la densidad dendrítica, puede afirmarse que el entrenamiento reduce el patrón de arborización. Aunque no permite definir si este cambio esta acompañado de una disminución del número de neuronas. Como la técnica sólo permite detectar NF en áreas limitadas del cuerpo estriado, no puede definirse si el mismo efecto se produce en el resto de la estructura.

### **4.3. EL GRADO DE ALTERACION NEUROQUIMICA DEPENDE DEL GRADO DE ESTIMULO MOTOR**

La evaluación de los cambios en el mAChR generados por el TEC aportó una serie de informaciones valiosas para caracterizar dicha alteración. Como se dijo anteriormente,

la variedad de estímulos no permite concluir fehacientemente que la respuesta se deba a un comportamiento motor y no al aprendizaje asociativo. De todos modos, existen varios factores que favorecerían esta visión. Los animales entre 30 y 90 días muestran un grado de aprendizaje similar, siempre de acuerdo a la utilización de los EA como parámetro de este fenómeno. Por el contrario, los animales de 20 días muestran un mayor número de EA, lo que indica un comportamiento diferente de este grupo experimental respecto a todos los demás evaluados. Estos resultados limitan la posibilidad de una relación entre el aprendizaje asociativo y los cambios neuroquímicos. Si dicha asociación existiera, no se comprende la razón por la cual entre los grupos que responden en forma similar (30 a 90 días) sólo los entrenados a partir de los 30 días muestran el cambio. Del mismo modo, el grupo de 20 días debería presentar características neuroquímicas diferentes a todos los otros grupos y no sólo a los de 30 días.

No obstante, puede argumentarse que otros marcadores del aprendizaje asociativo, más específicos o sensibles, podrían aportar resultados diferentes. De todos modos, una alteración permanente de semejantes proporciones en la densidad de receptores no favorece la idea de una modificación neuroquímica por aprendizaje.

Una estrategia para evaluar mejor esta problemática fue el entrenamiento de animales en el TDG. En el TDG el animal corre sobre una plataforma en movimiento, realizando una actividad motora circular pero sin que se produzca un aprendizaje asociativo. El aprendizaje motor, sigue presente pero probablemente no muestra las mismas características que las desarrolladas en el TEC. Si bien las dos pruebas, el TEC y el TDG, guardan muchas semejanzas desde el aspecto motor, también existen diferencias. En el TDG la plataforma se encuentra en movimiento en el sentido contrario al del giro del animal, mientras que en el TEC el piso está quieto. La actividad motora desarrollada en el TDG es regular y constante. En el TEC, el animal gira rápidamente hasta donde se encuentra la gota, demora unos segundos quieto bebiéndola y vuelve a acelerar para dar un nuevo giro. Por otra parte, desde el punto de vista motivacional también hay

diferencias. En el TEC este factor está claramente relacionado con la recompensa hídrica. En el TDG, la recompensa hídrica no existe, aunque no puede decirse que no exista un componente motivacional para que el animal se mueva. En realidad, no queda en claro cuál es la razón por la cual el animal, cuando es colocado en una plataforma en movimiento, comienza a trotar en lugar de quedarse quieto (de hecho algunos lo hacen, se quedan quietos). Evidentemente, la razón de esta actitud escapa al análisis y los objetivos del trabajo.

La evaluación de los cambios en el mAChR luego del TDG permite aportar nueva información. Luego de 3 meses de haber sido entrenados en el TDG, los animales muestran una caída en el mAChR de 43% en cuerpo estriado y de 24% en corteza motora. Este cambio es similar al encontrado con el TEC por lo que se puede concluir que el componente asociativo (ausente en el TDG) no participa en los cambios neuroquímicos del mAChR en estas estructuras. Como se vio para el caso del TEC, y nuevamente con el TDG, los cambios en el mAChR se producen en ambos lados del cerebro independientemente que realicen una actividad circular. Al igual que en el TEC, la caída del mAChR mostró una correlación con el número de vueltas acumuladas durante el entrenamiento y no se observó cambios en amígdala, hipocampo, cerebelo y otras áreas corticales.

Además, los entrenamientos realizados en el TDG permitieron demostrar que la caída del mAChR es proporcional tanto a la cantidad de actividad realizada (metros recorridos/número de sesiones) como a la intensidad de esta actividad (velocidad de giro). En este caso, ambas variables muestran una correlación más fuerte que la obtenida para el TEC. En particular, la importancia de la intensidad que, en el TDG, queda claro que participa en los cambios neuroquímicos. Es probable que las características particulares del comportamiento motor en el TDG permitan que el efecto de la actividad física sobre el mAChR se vea en forma más clara. Del mismo modo, es

probable que, de alguna manera no establecida, el resto de las variables que intervienen en el TEC distorsionen al menos en parte los resultados que se observan en el TDG.

Por otro lado, el entrenamiento en el TDG resulta similar, como modelo inductor de cambios plásticos, a la rueda giratoria. En este último, el animal es colocado sobre una rueda y al moverse sobre el lugar hace girar la misma. Una diferencia con el TDG es que, en este último, el animal realiza un recorrido circular y además se mueve de la posición inicial. Estudiando la actividad motora en la rueda giratoria, Neepér y colaboradores descubrieron que el ejercicio aumenta los niveles de ARNm de factores neurotróficos en hipocampo (216, 217). Los citados investigadores demostraron un aumento en el BDNF y el NGF. Estos cambios son fuertes indicadores del disparo de mecanismos plásticos por el entrenamiento físico como lo demuestra la diversa gama de efectos que producen las neurotrofinas en el cerebro (291). Otros estudios demostraron que el entrenamiento físico también puede modificar el número de receptores dopaminérgicos en el cuerpo estriado (193). Estos trabajos, tomados en conjunto, demuestran los efectos de la actividad motora sobre diversos parámetros neuroquímicos. El TDG, al igual que el TEC, ofrece resultados complementarios a dichos descubrimientos. También en este caso, los factores tróficos podrían desempeñar un papel importante.

#### **4.4. LOS CAMBIOS PERMANENTES EN EL mAChR SE CORRELACIONAN CON CAMBIOS INMEDIATOS**

##### **4.4.1. Internalización inmediata del mAChR luego del TDG: un posible paso inicial en la generación de los cambios permanentes.**

Los estudios con el TEC y el TDG mencionados anteriormente, permitieron determinar un período crítico durante el desarrollo donde la actividad motora puede generar cambios neuroquímicos permanentes. Es razonable pensar que los cambios a largo plazo en el mAChR sean consecuencias de modificaciones producidas durante la

actividad motora. Por ello, se analizó el efecto sobre el mAChR inmediatamente después del entrenamiento.

La primera conclusión de los estudios inmediatos en el TDG es que la actividad funcional produce una reducción importante de la detección del mAChR en el mismo período en el cual se generan cambios permanentes. Este efecto se observa 30 minutos después de terminada una sesión donde los animales giran 150 veces, recorriendo 150 metros.

Determinados en condiciones de subsaturación y luego de saturación los cambios parecen obedecer en la afinidad del mAChR y no a una reducción del número. Una primera característica llamativa fue que, si bien ambas estructuras estriatales (izquierda y derecha) mostraron una disminución de la unión a subsaturación, la caída fue más notoria en el cuerpo estriado contralateral al sentido de giro. A lo largo de este trabajo esta es la primera demostración de una variación asimétrica en este modelo de actividad circular. Este resultado parece indicar que el cuerpo estriado contralateral al sentido de giro responde de una manera más intensa al efecto del entrenamiento. No obstante, si esto está efectivamente relacionado con los cambios permanentes (donde no se observan asimetrías) debería existir algún mecanismo de regulación interhemisférica que lleva a un nuevo equilibrio entre las dos estructuras estriatales.

La participación de cambios dinámicos en el mAChR frente a condiciones de estimulación sináptica ya fue descrita en otros estudios. Efectivamente, las consecuencias inmediatas de la estimulación del mAChR ha sido estudiado desde distintas perspectivas. En todos los casos, el resultado fue la disminución del número de receptores. En experimentos con células en cultivos, la estimulación del mAChR con el agonista carbacol produce una internalización rápida del 25 al 30% del receptor expresado en membrana sináptica (122). Este proceso se produce con un tiempo medio de 10 minutos y revierte en un promedio de 20 minutos. Evidentemente, resulta imposible determinar si un proceso similar ocurre en el presente modelo experimental



debido a que el tiempo de entrenamiento excede la dinámica de dichos eventos. La internalización puede estar mediada por procesos de fosforilación. La estimulación del mAChR, por ejemplo, produce una activación de la pKC en membrana (70). Otros experimentos *in vitro* también demostraron que la administración de carbacol aumenta los niveles de pKC asociada a membrana (195). Esta activación de pKC se produce 5 minutos después de la administración del agonista colinérgico y perdura por 60 minutos. Como resultado, los investigadores observaron una internalización y degradación del mAChR, proceso que podía evitarse incubando al mismo tiempo el carbacol con el antagonista colinérgico atropina. Estos experimentos demuestran que la pKC puede estar involucrada en la regulación del número de mAChR. Dicho mecanismo de acción no es particular del mAChR, la desensitización del receptor luego de interacción con su agonistas es un proceso reconocido, aunque no se sabe si en todos los casos esta mediado por eventos fosforilativos. En cuerpo estriado, por ejemplo, la estimulación *in vivo* con sustancia P produce la internalización de más del 60% de su receptor (195). Este proceso se revierte dentro de los 60 minutos. El control de la pKC sobre el mAChR es una sospecha fundamentada en varias evidencias. Burgoyne descubrió que las condiciones de fosforilación producen una caída de la unión de ligando al mAChR en membranas sinápticas *in vitro* (34, 35). No obstante, sus experimentos no permiten identificar las quinasas específicas involucradas en dicho efecto. Por otra parte el mAChR puede ser fosforilado por la pKC *in vitro* (118). Aunque no ha sido comprobado *in vivo*, un mecanismo probable sería entonces que la estimulación del mAChR induciría un aumento de la actividad de pKC en membrana y, por acción directa o indirecta de los mecanismos de fosforilación, se produciría la internalización del receptor y degradación. Este proceso es compatible con la caída a largo plazo del receptor, si luego de disminuído el nivel de mAChR no se vuelve por neosíntesis a los niveles basales.

Por otra parte, experimentos comportamentales demostraron un aumento correlacionado de la pKC y la inmunoreactividad del mAChR en hipocampo (298). De todos modos, otros eventos fosforilativos, como los mediados por pKA podría actuar

sobre el mAChR (290), lo que impide realizar un análisis directo y simple del efecto de la pKC sobre el mAChR. También debe tenerse en cuenta la posibilidad de que no se produzca una fosforilación en forma directa sobre el mAChR. Aún así, puede influir en su densidad o afinidad mediante la activación o inactivación de otras proteínas reguladoras. De ser este el caso el análisis resulta más complicado aún.

Bajo esta hipótesis, las membranas de los animales entrenados y controles pueden presentar variaciones en su composición, como la presencia diferencial de proteínquinasas y otras proteínas reguladoras. Esas moléculas pueden afectar al mAChR. Por ejemplo, la activación de ciertas quinasas puede disminuir o aumentar la afinidad del mAChR. Si la composición molecular luego del entrenamiento difiere de los controles, entonces la activación de mecanismos de fosforilación puede generar una respuesta diferencial sobre el mAChR. Como demostrara Burgoyne, las condiciones fosforilantes afectan al mAChR. Para evaluar el efecto que distintas proteínquinasas podrían ejercer en el TEC, preparaciones de membrana de animales entrenados y controles fueron sometidas a condiciones de activación de pKC. Sin embargo, en los mencionados experimentos, no se observó un patrón de comportamiento diferencial en las membranas incubadas en condiciones de activación de pKC y de quinasas dependientes de calmodulina que indique esta posibilidad que pudiera ofrecer indicios de una respuesta diferencial del mAChR en los animales entrenados y en asociación a los mecanismos de fosforilación.

Más allá de la participación o no de los mecanismos de fosforilación, la desensibilización del mAChR podría ser uno de los pasos iniciales en la reducción del número de sinapsis a largo plazo. Precisamente, Colman y sus colegas, han demostrado en forma reciente que una reducción del número de receptores en la sinápsis podría preceder a la eliminación de la misma (44). Si bien dichas conclusiones fueron obtenidas a partir del estudio de la unión neuromuscular y de la evaluación del receptor colinérgico nicotínico, el mismo proceso básico podría ser extensivo al SNC y a este caso en particular. Los mencionados investigadores demostraron analizaron los registros

celulares en preparaciones donde cada célula muscular estaba inervada por múltiples axones y estudiaron la transición hasta la inervación simple. En sus experimentos observaron que si bien las distintas conexiones presentaban características similares al principio, con el tiempo comenzaban a diferenciarse en la fuerza de la unión sináptica. A partir de una disminución en la cantidad de neurotransmisor liberado y en la densidad post-sináptica del receptor colinérgico nicotínico, la sinápsis que sufría dichos cambios era eliminada en el plazo de 1 a 2 días. Explican en el trabajo que los sitios de contactos debilitados presentan una baja densidad sináptica de neuroreceptor y mantienen los terminales presinápticos en forma funcional hasta que se produce la eliminación.

No obstante, en las condiciones experimentales implementadas no se pudo observar una reducción del número del mAChR pero sí un cambio en la afinidad. Si este proceso de desensibilización está asociado o no a una posterior reducción en el número no puede ser comprobada ni refutada en base a estos resultados.

Sin embargo, una segunda línea experimental en marcha en nuestro laboratorio aportan nuevas posibilidades de análisis de los mecanismos intervinientes a corto plazo. Mediante el empleo del mismo diseño experimental, pudo demostrarse que, a los 30 minutos, la fosforilación *in vitro* de la GAP-43 es menor en la membrana sináptica IM de cuerpo estriado de animales entrenados (230). La GAP-43 es una proteína presináptica asociada al crecimiento axónico durante el desarrollo, cuya fosforilación está correlacionada con la liberación presináptica de neurotransmisores (57). En cuerpo estriado de rata, además, la fosforilación de GAP-43 está involucrada en los cambios plásticos de la liberación por efecto de la exposición farmacológica (99). La disminución de la capacidad de fosforilación, por lo tanto, podría estar asociada al efecto contrario, una reducción de la transmisión sináptica.

De acuerdo a los efectos del entrenamiento sobre el mAChR y la GAP-43, el debilitamiento de la conexión sináptica podría estar ocurriendo a través de una disminución de la liberación de neurotransmisores y de una desensibilización de la respuesta colinérgica como consecuencia de la estimulación física. La posibilidad de

que hipotéticos cambios de este tipo conduzcan finalmente a una eliminación sináptica, sería coherente con la reducción en el número de receptores observadas a largo plazo.

En el modelo de la unión neuromuscular, las conexiones neuronales en proceso de degeneración (eliminación sináptica no competitiva) muestran cambios similares en la liberación de neurotransmisores, luego de una axotomía (44). Los procesos de eliminación sináptica competitiva dependiente de la actividad que ocurren en las neuronas del SNC podrían desarrollar un proceso de este tipo. En dicho caso, una vez fortalecidas algunas sinapsis neuronales es posible que las conexiones no favorecidas sean eliminadas por un mecanismo similar al operante en la unión neuromuscular. De este modo, podrían generarse alteraciones permanentes en las conexiones entre neuronas en el cerebro.

En este sentido, el LTP y el LTD podrían ser los mecanismos involucrados en el fortalecimiento o debilitamiento de una conexión respecto a otra (22, 188). De hecho, este tipo de cambios prolongados de la eficacia de la transmisión sináptica, dependientes de la actividad, son considerados como un factor crucial para el desarrollo de circuitos neuronal en el cerebro de mamíferos. En el cuerpo estriado, recientemente fue demostrado que la estimulación tetánica de las fibras corticoestriatales puede inducir tanto LTP como LTD en la transmisión excitatoria del cuerpo estriado (37). Dichos hallazgos confirman la posibilidad de desencadenar estos mecanismos en dicha estructura y podrían participar, junto con la reducción del mAChR observada en el corto plazo, en la generación de cambios de conectividad permanentes luego del entrenamiento motor.

#### **4.4.2. La estimulación del c-fos puede potenciar los cambios plásticos**

La observación de que la estimulación motora induce la expresión del proto-oncogén c-fos amplía de una manera sustancial la gama de eventos plásticos que pueden participar en los cambios neuroquímicos en cuerpo estriado.

Los factores que dan origen a la expresión del c-fos forman una lista muy extensa que involucra estímulos de una diversidad enorme. En particular, para este trabajo, resulta importante nombrar que tanto la dopamina como la acetilcolina pueden afectar su expresión. De acuerdo a diversos estudios, queda claro que la respuesta diferencial a los neurotransmisores permite identificar distintas poblaciones celulares. Las neuronas gabaérgicas que proyectan al globo pálido, inducen su expresión como consecuencia de la estimulación colinérgica sobre el M1 y la reprimen como respuesta a la estimulación dopaminérgica sobre el D2. Por el contrario, la actividad dopaminérgica estimula la expresión y la acetilcolina la reprime en la subpoblación de neuronas gabaérgicas que proyectan a la sustancia nigra. En el presente estudio, no se puede identificar a qué población neuronal pertenecen las neuronas activadas, por lo cual no puede determinarse cuál de ambos mecanismos está funcionando. Inclusive es posible que los dos sistemas de neurotransmisión mencionados estén involucrados, así como que las células activadas pertenezcan a ambas poblaciones de neuronas gabaérgicas. Dado el pequeño porcentaje relativo de células activadas, es evidente que ninguna de las poblaciones es estimulada en forma completa.

También hay que considerar que la respuesta del c-fos sea independiente de los cambios a largo plazo. De acuerdo a estudios realizados en ratones, la inducción del c-fos dependiente del receptor D1 es máxima a los 3 días de desarrollo postnatal pero decrece paulatinamente hasta ser prácticamente nula a partir del día 21 (8). Si un fenómeno similar ocurre en ratas, esto podría indicar que el bajo número relativo de neuronas que expresan c-fos está relacionado con una disminución del papel que desempeña esta molécula en los fenómenos plásticos motores. No obstante, esta interpretación puede ser equivocada pues no existe ningún evento fisiológico contra el cual comparar la expresión del c-fos para determinar si el número de neuronas que los expresan son numerosas o escasas. De hecho, puede ser que, en realidad, la detección de menos del 10% de neuronas que expresan c-fos significa la existencia de un proceso de amplias

connotaciones. De todos modos, se desconocen las consecuencias específicas que esta activación provoca a largo plazo en el cuerpo estriado u otra estructura cerebral. Probablemente las posibilidades son muchas y dependerán de otros factores concomitantes. Por ser un miembro de la familia de los genes de expresión inmediata, el c-fos es un factor de transcripción que controla la expresión de numerosos genes blancos en el SNC (251). Regulado a su vez por la actividad neuronal, se considera que el c-fos desempeña un papel importante sobre las propiedades plásticas neuronales dependientes de la actividad. Bajo esta interpretación, el c-fos puede estar asociado a los cambios neuroquímicos permanentes que desencadena el entrenamiento motor realizado en este trabajo.

#### 4.5. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS RESULTADOS

El presente trabajo demuestra que la **actividad funcional** ejerce profundos cambios neuroquímicos en el SNC en desarrollo. Como fuera comprobado mediante el estudio de plasticidad visual, la capacidad de desarrollar cambios permanentes presenta una restricción de tiempo, demarcando un «período de sensibilidad» o «período crítico». La remoción en el modelo visual o la alteración del estímulo en el presente modelo, permite producir cambios importantes, observados a nivel neuroquímico y posiblemente correlacionados con cambios de la organización estructural del sistema afectado.

Los cambios del **mAChR** en este modelo motor representan la primera demostración experimental de un **cambio neuroquímico permanente** desencadenado por la actividad física. En el ámbito médico, esto representa una fundamentación neuroquímica a la aplicación empírica de la estimulación motora temprana como método terapéutico. Interfiriendo con el desarrollo normal se puede mejorar un déficit congénito o deteriorar permanentemente un sistema normal.

El período de sensibilidad de distintas estructuras cerebrales y la posibilidad, por lo tanto, de modificar diferentes marcadores moleculares puede encontrarse a distintos tiempos del desarrollo y con distinta longitud del período de sensibilidad.

Por otra parte, aunque se produzcan alteraciones, las consecuencias de las mismas dependerán de la capacidad del SNC para compensar los cambios. De manera que la variación a nivel molecular, no implica necesariamente un beneficio o un déficit. De todos modos, desde este punto de vista puede evaluarse la posibilidad de alterar el SNC. Realizado ya, mediante manipulación farmacológica y por privación sensorial, el presente trabajo presenta un nuevo enfoque para generar cambios permanentes, la estimulación motora. Por lo tanto, representa un modelo para el estudio de la plasticidad motora y de otros eventos relacionados con las estructuras involucradas en los cambios. A diferencia del modelo de plasticidad visual, principalmente sensorial, el presente modelo se centra en una estructura efectora de funciones nerviosas centrales. La posibilidad de manipular la estimulación (e.g. velocidad, número de vueltas) permite realizar valoraciones cuantitativas de los cambios. Los resultados obtenidos permiten profundizar el estudio de los mecanismos que regulan la neurotransmisión y estudiar la relación entre distintas moléculas, como los neuroreceptores, y los procesos plásticos con distintos objetivos. De esta manera, la profundización de los resultados expuestos puede ofrecer respuestas en distintos campos donde la plasticidad motora es de importancia. Entre ellos, el estudio de distintas neuropatologías motoras, de los procesos regenerativos y degenerativos del sistema nervioso motor, del aprendizaje y del desarrollo motor del SNC.

## CONCLUSIONES

El trabajo expuesto presenta el primer ejemplo de la generación de **cambios neuroquímicos permanentes** en el SNC de mamíferos como consecuencia de una **actividad física**. Del mismo modo, se demostró la presencia de un **período crítico** durante el desarrollo postnatal del SNC durante el cual la estimulación motora puede generar cambios perdurables en la conectividad sináptica en una forma dependiente de la actividad.

Los resultados obtenidos permiten interpretar desde otra perspectiva distintos fenómenos de importancia neurobiológica como ser: la interacción colinérgica-dopaminérgica en el cuerpo estriado, la regulación de la expresión del mAChR, así como la participación de los neuroreceptores y el papel de la actividad motora en los mecanismos plásticos dependientes de la actividad. Los estudios a corto plazo sobre el mAChR, por otra parte, abren la posibilidad de entender los mecanismos que desencadenan los cambios permanentes y definen el patrón de conectividad nerviosa.



**REFERENCIAS**

1. Abbadie, Honoré P, Besson JM. Intense cold noxious stimulation of the rat hindpaw induces c-fos expression in lumbar spinal cord neurons. *Neurosci* **59**: 457-468, 1994.
2. Ahlskog JE, Richelson E, Nelson A, Kelly PJ, Okazaki H, Tyce GM, van Heerden JA, Stoddard SL, Carmichael SW. Reduced D2 dopamine and muscarinic cholinergic receptor densities in caudate specimens from fluctuating Parkinsonian patients. *Ann Neurol* **30**: 185-191, 1991.
3. Aigner TG. Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Curr Op Neurobiol* **5**: 155-160, 1995.
4. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* **12**: 366-375, 1989.
5. Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* **5**: 297-306, 1990.
6. Aosaki T, Graybiel AM, Kimura M. Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural response in the striatum of behaving monkeys. *Science* **265**: 412-415, 1994.
7. Arbuthnott GW, Crow TJ. Relation of contraversive turning to unilateral release of dopamine from the nigrostriatal pathway in rats. *Exp Neurol* **30**: 484-491, 1971.

8. Arnauld E, Arsaut J, Tafani JAM, Demotes-Mainard J. Dopaminergic control of gene transcription during striatal ontogeny: c-fos induction by D1 receptor activation in the developing striosomes. *Mol Brain Res* **30**:223-232, 1995.
9. Aronin N, DiFiglia M, Graveland GA, Schwartz WJ, Wu JY. Localization of immunoreactive enkephalins in GABA synthesizing neurons of the rat neostriatum. *Brain Res* **300**: 376-380, 1984.
10. Ashkenazi A, Winslow JW, Peralta EG, Peterson GL, Schimerlik MI, Capon DJ, Ramachandran J. An M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science* **238**: 672--675, 1987.
11. Ashkenazi A, Peralta EG, Winslow JW, Ramachandran J, Capon J. Functionally distinct G proteins selectively couple different receptor to PI hydrolysis in the same cell. *Cell* **56**: 487-493, 1989.
12. Aubert I, Cécyre D, Gauthier S, Quirion R. Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors in the rat brain. *J Comp Neurol* **369**: 31-55, 1996.
13. Azcurra JM, De Robertis E. Binding of dimethyl-C14-d-Tubocurarine, methyl-C14-Hexamethonium, and H3-Alloferine by isolated synaptic membranes of brain cortex. *Int J Neuropharmacol* **6**: 15-26, 1967.
14. Baldessarini RJ, Tarsy D. Dopamine and the pathophysiology of dyskinesias induced by antipsychotic drugs. *Ann Rev Neurosci* **3**: 23-41, 1980.

15. Barbeau A, Mars H, Gillo-Joffroy L. Adverse clinical side effects of levodopa therapy. En *Recent Advances in Parkinson's Disease*. Ed. MacDowell FH, Markham CH. pp 203-208. Philadelphia: Davis, 1971.
16. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction: a critical review. *Science* **217**: 408-417, 1982.
17. Bear MF, Singer W. Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature* **320**: 172-176, 1986.
18. Becker JB, Beer ME. The influence of estrogen on nigrostriatal dopamine activity: behavioral and neurochemical evidence for both pre- and postsynaptic components. *Behav Brain Res* **19**: 27-33, 1986.
19. Bennett EL, Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR. Chemical and anatomical plasticity of brain. *Science* **146**: 610-619, 1964.
20. Bigl V, Arendt T. Cholinergic neurons of the central nervous system: morphofunctional aspects. *Acta Psychiatr Scand Suppl* **366**: 7-13, 1991.
21. Birdsall N, Buckley N, Doods H, Fukuda K, Giachetti A, Hammer R, Kilbinger H, Lambrecht G, Mutschler. Nomenclature for muscarinic receptor subtypes recommended by symposium. *Trends Pharmacol Sci Suppl* **VII**, 1989.
2. Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**: 331-334, 1973.

23. Blockland A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Rev* **21**: 285-300, 1996.
24. Blomquist KB, Danner F. Effects of physical conditioning on information-processing efficiency. *Percept Mot Skills* **65**: 175-186, 1987.
25. Blumenthal JA, Emery CF, Madden DJ, Schniebolk S, Walsh RM, George LK, McKee DC, Higginbotham MB, Cobb FR, Coleman RE. Long-term effects of exercise on psychological functioning in older men and women. *J Gerontol* **46**: 352-361, 1991.
26. Boatell LL, Lindefors N, Ballarin M, Ernfors P, Mahy N, Persson H. Activation of basal forebrain cholinergic neurons differentially regulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in different projection areas. *Neurosci Lett* **136**: 203-208, 1992.
27. Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ. Identification of a family of muscarinic receptor genes. *Science* **237**: 527-532, 1987.
28. Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**: 403-410, 1988.
29. Bouyer JJ, Park DH, Joh TH, Pickel VM. Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res* **302**: 267-275, 1984.
30. Brendt DS, Hwang PM, Snyder HS. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**: 768-770, 1990.

31. Brusés JL, Berninsone PM, Ojea SI, Azcurra JM. The circling training rat model as a behavioral teratology test. *Pharmacol Biochem Behav* **38**: 739-745, 1991.
32. Brusés JL, Azcurra JM. The circling training: A behavioral paradigm for functional teratology testing. En: *Methods in Neuroscience, Paradigms for the study of behavior*. Conn PM (Ed). Academic Press, New York.
33. Buckley NJ, Bonner TI, Brann MR. Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* **8**: 4646-4652, 1988.
34. Burgoyne RD. A possible role of synaptic-membrane protein phosphorylation in the regulation of muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS Lett* **122**: 288-292, 1980.
35. Burgoyne RD. The loss of muscarinic acetylcholine receptors in synaptic membranes under phosphorylation conditions is dependent on calmodulin. *FEBS Lett* **127**: 144-148, 1981.
36. Butters N, Salmon DP, Heindel WV. Specificity of the memory deficits associated with basal ganglia dysfunction. *Rev Neurol (Paris)* **150**: 580-587, 1994.
37. Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci* **19**:19-24, 1996.
38. Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia - implication for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* **13**: 272-276, 1990.
39. Carlton PL. Cholinergic mechanisms in the control of behavior by the brain. *Psychol Rev* **70**:19-39, 1963.

40. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159, 1987.
41. Christie JE, Crow TJ. Turning behavior as an index of the action of amphetamines and ephedrines on central dopamine-containing neurones. *Br J Pharmacol* **43**: 658-667, 1971.
42. Clarkson-Smith L, Hartley AA. Relationships between physical exercise and cognitive abilities in older adults. *Psychol Aging* **4**: 183-189, 1989.
43. Cochran BH, Zullo J, Verma IM, Stiles CD. Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science* **226**: 1080-1082, 1984.
44. Colman H, Nabekura J, Lichtman JW. Alteration of synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science* **275**:356-361, 1997.
45. Cools A, Van den Bercken J, Horstink M, Van Spaendonck K, Berger H. The basal ganglia and the control of movement: the basal ganglia and the programming of behavior. *Trends Neurosci* **4**: 124, 1981.
46. Cotman CW, Nieto-Sampedro M, Harris EW. Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. *Physiol Rev* **61**:684-784, 1981.
47. Cotman CW, Sampedro MN. Cell biology of synaptic plasticity. *Science* **225**:1287-1294, 1984.

48. Coyle JT, Yamamura HI. Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res* **118**: 429-440, 1976.
49. Coyle JT, Campochiaro P. Ontogenesis of dopaminergic-cholinergic interactions in the rat striatum. A neurochemical study. *J Neurochem* **27**: 673-678, 1976.
50. Cowan WM, Fawcett JA, O'Leary DDM, Stanfield BB. Regressive events in neurogenesis. *Science* **225**: 1258-1265, 1984.
51. Cramer KS, Sur M. Activity-dependent remodeling of connections in the mammalian visual system. *Curr Op Neurobiol* **5**: 106-111, 1995.
52. Curran T, Morgan JI. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science* **229**: 1265-1268, 1985.
53. Curtis DR, Eccles RM. The excitation of Renshaw cells by pharmacological agents applied electrophoretically. *J Physiol Lon* **141**: 435-445, 1958.
54. Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* **6**: 147-190, 1914.
55. Darwin C. *The descent of man*. pg 53. Rand, McNally (Eds). Chicago, 2° edición, 1974.
56. Das GD, Altman J. Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat. *Brain Res* **21**: 122-127, 1970.

57. Dekker LV, DeGraan PNE, Versteeg DHG, Oestreicher AB, Hispen WH. Phosphorylation of B-50 (GAP-43) is correlated with neurotransmitter release in hippocampal slices. *J Neurochem* **53**: 24-30, 1989.
58. Dewar KM, Reader TA. Specific [3H]SCH23390 binding to dopamine D1 receptors in cerebral cortex and neostriatum: Role of disulfide and sulphhydryl groups. *J Neurochem* **52**:472-482, 1989.
59. Diamond J, Holmes M, Coughlin M. Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. *J Neurosci* **12**: 1454-1466, 1992.
60. Diana M, Garcia-Muñoz M, Richards J, Freed CR. Electrophysiological analysis of dopamine cells from the substantia nigra pars compacta of circling rats. *Exp Brain Res* **74**: 625-630, 1989.
61. DiChiara G, Carboni E, Morelli M, Cozzolino A, Tanda GL, Pinna A, Russi G, Consolo S. Stimulation of dopamine transmission in the dorsal caudate nucleus by pargyline as demonstrated by dopamine and acetylcholine microdialysis and Fos immunohistochemistry. *Neurosci* **55**: 451-456, 1993.
62. DiChiara G, Morelli M, Consolo S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum. Ach/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci* **17**: 228-233, 1994.
63. DiFiglia M, Pasik P, Pasik T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* **114**: 245-256, 1976.
64. Divac I, Markowitsch HJ, Pritzel M. Behavioral and anatomical consequences of small intrastriatal injections of kainic acid in the rat. *Brain Res* **151**:523-532, 1978.



65. Donoghue JP, Herkenham M. Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* **365**: 397-403, 1986.
66. Dudek SM, Bear MF. A biochemical correlate of the critical period for synaptic modification in the visual cortex. *Science* **240**:673-675, 1989.
67. Dunbar GL, Lescaudron LL, Stein DG. Comparison of GM1 ganglioside, AGF2, and D-amphetamine as treatments for spatial reversal and place learning deficits following lesions of the neostriatum. *Behav Brain Res* **54**: 67-79,1993.
68. Dustman RE, Emmerson RY, Ruhling RO, Shearer DE, Steinhaus LA, Johnson SC, Bonekat HW, Shigeoka JW. Age and fitness effects on EEG, ERPs, visual sensitivity and cognition. *Neurobiol Aging* **11**: 193-200, 1990.
69. Eckenstein FP, Baughmann RW, Quinn J. An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neurosci* **25**: 457-474, 1988.
70. El-Fakahany EE, Alger BE, Lai WS, Pitler TA, Worley PF, Baraban JM. Neuronal muscarinic responses: role of protein kinase C. *FASEB J* **2**: 2575-2583, 1988.
71. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**:88-95, 1961.
72. Emmerson RY, Dustman RE, Shearer DE, Turner CW. P3 latency and symbol digit performance correlations in aging. *Exp Aging Res* **15**: 151-159, 1989.

73. Euvrard C, Labrie F, Boissier JR. Effect of estrogen on changes in the activity of striatal cholinergic neurons induced by DA drugs. *Brain Res* **169**:215-220, 1979.
74. Fallon JH, Leslie FM. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J Comp Neurol* **249**: 293-336, 1986.
75. Feigenbaum P, El-Fakahany E. Regulation of muscarinic cholinergic density in neuroblastoma cells by brief exposure to agonist: Possible involvement in desensitization of receptor function. *J Pharmacol Exp Ther* **233**:134-140, 1985.
76. Figueredo-Cárdenas G, Anderson KD, Chen Q, Veenman CL, Reiner A. Relative survival of striatal projection neurons and interneurons after intrastriatal injection of quinolinic acid in rats. *Exp Neurol* **125**:37-56, 1994.
77. Fine A. Human fetal tissue research: practice, prospects and policy. *Cell Transpl* **3**: 113-145, 1994.
78. Fisher RS, Shiota C, Levine MS, Hull CD, Buchwald NA. Interhemispheric organization of corticocaudate projections in the cat: a retrograde double-labelling study. *Neurosci Lett* **48**: 369-373, 1984.
79. Fordyce DE, Farrar RP. Physical activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial learning in F344 rats. *Behav Brain Res* **43**: 115-123, 1991.
80. Fordyce DE, Starnes JW, Farrar RP. Compensation of the age-related decline in hippocampal muscarinic receptor density through daily exercise or underfeeding. *J Gerontol* **46**: 245-248, 1991.

81. Fox DA. Physiological and neurobehavioral alterations during development in lead exposed rats. *Neurobehav Toxicol* **1**: 193-206, 1979.
82. Fox K, Sato H, Daw NW. The location and function of NMDA receptors in cat and kitten visual cortex. *J Neurosci* **9**:2443-2454, 1989.
83. Frank E. The influence of neuronal activity on patterns of synaptic connections. *Trends Neurosci* **10**: 188-190, 1987.
84. Freund TF, Powell JG, Smith AD. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contacts with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci* **13**: 1189-1216, 1984.
85. Galper JB, Dziekan LC, O'Hara DS, Smith TW. The biphasic response of muscarinic cholinergic receptor in cultured heart cells to agonists. *J Biol Chem* **257**:10344-10356, 1982.
86. Garofalo L, Ribeiro-Da-Silva A, Cuello AC. Nerve growth factor-induced synaptogenesis and hypertrophy of cortical cholinergic terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:2639-2643, 1992.
87. Garraghty PE, Sur M. Competitive interactions influencing the development of retinal axonal arbors in cat lateral geniculate nucleus. *Physiol Rev* **73**: 529-545, 1993.
88. Gerfen CR. The neostriatal mosaic: compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in rat. *J Comp Neurol* **236**:454-476, 1985.
89. Gerfen CR. The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* **246**: 385-388, 1990.

90. Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the Basal Ganglia. *Ann Rev Neurosci* **15**:285-320, 1992.
91. Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* **15**: 133-139, 1992.
92. Geyer MA. Approaches to the characterization of drug effects on locomotor activity in rodents. En: Testing and evaluation of drugs of abuse. *Modern methods in Pharmacology* **6**: 81-99, 1990. Wiley-Liss, Inc.
93. Gilliam PE, Spirduso WW, Martin TP, Walters TJ, Wilcox RE, Farrar RP. The effects of exercise training on 3H-Spiperone binding in rat striatum. *Pharmacol Biochem Behav* **20**: 863-867, 1984.
94. Glazewski S, Kossut M, Siucińska E, Skangiel-Kramska J. Cholinergic markers in the plasticity of murin barrel field. *Acta Neurobiol Exp* **50**: 163-172, 1990.
95. Gleser J, Mendelberg H. Exercise and sport in mental health: a review of literature. *Isr J Psychiatry Relat Sci* **27**: 99-112, 1990.
96. Glick SD, Jerussi TP, Fleisher LN. Turning in circles: the neuropharmacology of rotation. *Life Sci* **18**: 889-896, 1976.
97. Glick SD, Cox RD. Nocturnal rotation in normal rats: correlation with amphetamine-induced rotation and effects of nigrostriatal lesions. *Brain Res* **150**: 149-161, 1978.

98. Glick SD, Lyon RA, Hinds PA, Soweck C, Titeler M. Correlated asymmetries in striatal D1 and D2 binding: relationship to apomorphine-induced rotation. *Brain Res* **455**:43-48, 1988.
99. Gnegy ME, Hong P, Ferrell ST. Phosphorylation of neuromodulin in rat striatum after acute and repeated intermittent amphetamine. *Mol Brain Res* **20**: 289-298, 1993.
100. Goldman-Rakic PS. Cytoarchitectonic heterogeneity of the primate neostriatum: subdivision into island and matrix cellular compartments. *J Comp Neurol* **205**:398-413, 1982.
101. Goodman CS, Shatz CJ. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* **72/Neuron** **10** (Suppl): 77-98, 1993.
102. Granholm E, Bartzokis G, Asarnow RF, Marder SR. Preliminary associations between motor procedural learning, basal ganglia T2 relaxation times, and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Psychiat Res* **50**: 33-44, 1993.
103. Graveland GA, DiFiglia M. The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res* **327**: 307-311, 1985.
104. Graybiel AM, Ragsdale Jr CW. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci* **75**: 5723-5726, 1978.
105. Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 6912-6916, 1990.

106. Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **13**: 244-254, 1990.
107. Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* **265**:1826-1831, 1994.
108. Graybiel AM. The basal ganglia. *Trends Neurosci* **18**: 60-62, 1995.
109. Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* **234**: 80-83, 1986.
110. Greene LA. The importance of both early and delayed responses in the biological actions of nerve growth factor. *Trends Neurosci* **7**: 91-94, 1984.
111. Gross-Bellard M, Oudet P, Chambon P. Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem* **36**:32-38, 1973.
112. Gu Q, Singer W. Blockade of muscarinic receptors prevents ocular dominance plasticity of kitten striate cortex. *ENA (Abstr)* **11**: 73, 1988.
113. Guo N, Robertson GS, Fibiger HC. Scopolamine attenuates haloperidol-induced c-fos expression in the striatum. *Brain Res* **588**: 164-167, 1992.
114. Gwag BJ, Springer JE. Activation of NMDA receptors increases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the hippocampal formation. *Neuroreport* **5**: 125-128, 1993.

115. Habecker BA, Tietje KM, van Koppen CJ, Creason SA, Goldman PS, Migeon JC, Parenteau LA, Nathanson NM. Regulation of expression and function of muscarinic receptors. *Life Sci* **52**: 429-432, 1993.
116. Haga K, Haga T. Affinity chromatography of the muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **258**: 13575-13579, 1983.
117. Haga K, Haga T. Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine brain. *J Biol Chem* **260**: 7927-7935, 1985.
118. Haga K, Haga T, Ichiyama A. Phosphorylation by protein kinase C of the muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurochem* **54**: 1639-1644, 1990.
119. Haga T, Haga K, Kameyama K, Nakata H. Phosphorylation of muscarinic receptors: Regulation by G proteins. *Life Sci* **52**: 421-428, 1993.
120. Hahm JO, Langdon RB, Sur M. Disruption of retinogeniculate afferent segregation by antagonists to NMDA receptors. *Nature* **351**: 568-570, 1991.
121. Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJM, Burgen ASV, Hulme EC. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* **283**: 90-92, 1980.
122. Harden TK, Petch LA, Traynelis SF, Waldo GL. Agonist-induced alteration in the membrane form of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* **260**: 13060-13066, 1985.
123. Hattori T, McGeer PL. Synaptogenesis in the corpus striatum of infant rat. *Exp Neurol* **38**: 70-79, 1973.

124. Hattori T, McGeer EG, McGeer PL. Fine structural analysis of the cortico-striatal pathway. *J Comp Neurol* **185**: 347-354, 1979.
125. Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* **195**: 123-137, 1980.
126. Hersch SM, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Levey AI. Distribution of m1-m4 muscarinic receptor protein in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci* **14**: 3351-3363, 1994.
127. Hikosaka O, Wurtz RH. Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. III. Memory-contingent visual and saccade responses. *J Neurophysiol* **49**: 1268-1284, 1983.
128. Ho AKS, Ling QL, Duffield R, Lam PH, Wang JH. Phosphorylation of brain muscarinic receptor: Evidence of receptor regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **142**: 911-918, 1987.
129. Honda K, Takano Y, Kamiya H. Changes in 3H-quinuclidinylbenzilate binding and protein synthesis in the striatum following chronic administration of muscarinic agonist. *J Pharmacol* **67**:83-86, 1995.
130. Hokfelt T, Ljungdahl A, Terenius L, Elde R, Nilsson G. Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 3081-3085, 1977.



131. Hosey MM. Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J* **6**: 845-852, 1992.
132. Howlett DR, Nahorski SR. A comparative study of [3H]-Haloperidol and [3H]-Spiroperidol binding to receptors on rat cerebral membranes. *FEBS Letters* **87**: 152-156, 1978.
133. Hruska RE, Silbergeld EK. Increased dopamine receptor sensitivity after estrogen treatment using the rat rotation model. *Science* **208**: 1466-1468, 1980.
134. Hubel DH, Wiesel TN. Receptive fields binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol Lond* **160**: 106-154, 1962.
135. Hubel DH, Wiesel TN. Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol* **28**:1041-1059, 1965.
136. Hubel DH, Wiesel TN. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J Physiol* **195**: 215-243, 1968
137. Hung CR, Hong JS, Bondy SC. Lack of asymmetrical distribution of receptor binding sites and of neurally active peptides within rat brain. *Neurosci* **7**:2295-2298, 1982.
138. Hyde JF, Jerussi TP. Bilateral neurochemical changes induced by unilateral cerebral haloperidol administration: evidence for cerebral assimetry in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **42**:457-464, 1992.

139. Hydén H, Cupello A, Palm A. Increased binding of GABA to its post-synaptic carrier sites on the plasma membrane of Deiter's neurons after a learning experiment in rats. *Brain Res* **294**:37-45, 1984.
140. Izzo PN, Bolam JP. Cholinergic synaptic input to different parts of spiny striatonigral neurons in the rat. *J Comp Neurol* **269**: 219-234, 1988.
141. Jacobson M (Ed). *Developmental neurobiology*. 2nd edition. Plenum Press, New York, 1978.
142. Jenkins FJ. Basic methods for the detection of PCR products. *PCR methods and applications* **3**:S77-S82, 1994.
143. Jones EG, Wise SP. Cells of origin and terminal distribution of corticostriatal fibers arising in the sensory-motor cortex of monkeys. *J Comp Neurol* **173**: 53-80, 1977.
144. Kaas JH. The reorganization of somatosensory cortex following peripheral nerve damage in adult and developing mammals. *Ann Rev Neurosci* **6**: 325-356, 1983.
145. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* **10**: 3421-3438, 1990.
146. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* **18**: 527-535, 1995.
147. Kemp JL, Powell TPS. Cortico-striate projections in the monkey. *Brain* **93**: 525-546, 1970.

148. Kerns JM, Sierens DK, Kao LC, Klawans HL, Carvey PM. Synaptic plasticity in the rat striatum following chronic haloperidol treatment. *Clin Neuropharmacol* **15**: 488-500, 1992.
149. Kesner RP, Bolland BL, Dakis M. Memory for spatial locations, motor responses, and objects: triple dissociation among the hippocampus, caudate nucleus, and extrastriale visual cortex. *Exp Brain Res* **93**: 462-470, 1993.
150. Kinnier Wilson SA. *Modern Problems in Neurology*. Ed. Edward Arnold & Co. London, 1928.
151. Kirk R. *Experimental design: Procedures for the behavioral sciences*. Wadsworth Publishing Company. Belmont, USA 1968.
152. Kitai ST, Kocsis JD, Wood J. Origin and characteristics of the cortico-caudate afferents: an anatomical and electrophysiological study. *Brain Res* **118**: 137-141, 1976.
153. Kitai ST, Surmeier DJ. Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv Neurol* **60**: 40-52, 1993.
154. Klein WL, Nathanson NM, Nirenberg M. Muscarinic acetylcholine receptor regulation by accelerated rate of receptor loss. *Biochem Biophys Res Comm* **90**:506-512, 1979.
155. Klinzova A, Uranova NA, Haselhorst U, Schenk H. Synaptic plasticity in rat medial prefrontal cortex under chronic haloperidol treatment produced behavioral sensitization. *J Hirnforsch* **31**: 173-179, 1990.

156. Klose M, Bentley D. Transient pioneer neurons are essential for formation of an embryonic peripheral nerve. *Science* **245**: 982-983, 1989.
157. Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. A neostriatal habit learning system in humans. *Science* **273**: 1399-1402, 1996.
158. Kohler W. *The place of value in a world of facts*. pg 239. Liveright, New York, 1938.
159. Kohmura E, Takamichi Y, Kazuo Y, Sakaguchi T, Wanaka A, Hayakawa T. Expression of c-fos mRNA after cortical ablation in rat brain is modulated by basic fibroblast growth factor (bFGF) and the NMDA receptor is involved in c-fos expression. *Mol Brain Res* **28**: 117-121, 1995.
160. Konradi C, Cole RL, Heckers S, Hyman SE. Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *J Neurosci* **14**: 5623-5634, 1994.
161. Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 177-184, 1992.
162. Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**: 411-416, 1986.
163. Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Matsuo H, Hirose T, Numa S. Primary structure of porcine

cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* **209**: 367-372, 1986.

164. Kunzle H. Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res* **88**: 195-209, 1975.

165. Kunzle H. Projections from the primary somatosensory cortex to basal ganglia and thalamus in the monkey. *Brain Res* **30**: 481-492, 1977.

166. Kwatra MM, Leung E, Maan AC, McMahon KK, Ptasienski J, Green RD, Hosey MM. Correlation of agonist-induced phosphorylation of chick heart muscarinic receptors with receptor desensitization. *J Biol Chem* **262**: 16314-16321, 1987.

167. Lamour Y, Dutar P, Jobert A. Excitatory effect of acetylcholine on different types of neurons in the first somatosensory neocortex of the rat: laminar distribution and pharmacological characteristics. *Neurosci* **7**: 1483-1494, 1988.

168. Land PW, Simons DJ. Cytochrome oxidase staining in the rat SMI barrel cortex. *J Comp Neurol* **238**: 225-235, 1985.

169. Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Testa CM, Penney JB Jr, Young AB. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J Neurosci* **15**: 5297-5307, 1995.

170. Lauder JM, Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol* **155**: 469-482, 1974.

171. Lauder JM, Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. II. Synaptogenesis. *J Comp Neurol* **163**: 251-264, 1975.
172. Lavoie B, Parent A, Bédard PJ. Effects of dopamine denervation on striatal peptide expression in parkinsonian monkeys. *Can J Neurol Sci* **18**: 373-375, 1991.
173. Lehmann J, Langer SZ. The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals? *Neurosci* **10**: 1105-1120, 1983.
174. LeMoine C, Bloch B. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* **355**:418-426, 1995.
175. Lenn NJ. Neuroplasticity and the developing brain: implications for therapy. *Pediatr Neurosci* **13**: 176-183, 1987.
176. Le Vay S, Wiesel TN, Hubel DH. Laminar and columnar distribution of geniculocortical fibers in the macaque-monkey. *J Comp Neurol* **146**: 421-450, 1972.
177. Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* **11**: 3218-3226, 1991.
178. Levey AI, Edmunds AM, Heilman CJ, Desmond TJ, Frey KA. Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neurosci* **63**: 207-221, 1994.

179. Li M, Wall SJ, Yasuda RP, Ciesla W, Wolfe BB. Development of subtype selective antisera for the m1-m5 muscarinic cholinergic receptors. *Soc Neurosci Abstr* **17**: 1532, 1991.
180. Li M, Yasuda RP, Wall SJ, Wellstein A, Wolfe BB. Distribution of m2 muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for m2 receptors. *Mol Pharmacol* **30**: 28-35, 1991.
181. Liao CF, Themmen APN, Joho R, Barberis C, Birnbaumer M, Birnbaumer L. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **264**: 7328-7337, 1989.
182. Liberini P, Reuben M, Clarke PBS, Cuello AC. Nerve growth factor treatment resotres [<sup>3</sup>H]QNB binding site density in adult rat subjected to cortical infarction. *Neuroreport* **6**: 419-420, 1995.
183. Lichtman S, Poser EG. The effects of exercise on mood and cognitive functioning. *J Psychosom Res* **27**: 43-52, 1983.
184. Liles WC, Hunter DD, Meier KE, Nathanson NM. Activation of protein kinase C induces rapid internalization and subsequent degradation of muscarinic acetylcholine receptors in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **261**: 5307-5313, 1986.
185. Liles WC, Nathanson NM. Regulation of neuronal muscarinic receptor number by protein glycosylation. *J Neurochem* **46**:89-95, 1986.
186. Liles WC, Taylor S, Finnell R, Lai H, Nathanson NM. Decreased muscarinic acetylcholine receptor number in the CNS of the tottering (tg/tg) mouse. *J Neurochem* **46**:977-982, 1986.

187. Lin LFH, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260**: 1130-1132, 1990.
188. Linden DJ. Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* **12**: 457-472, 1994.
189. Lipton SA, Kater SB. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci* **12**: 265-270, 1989.
190. Liu J, Nickolenko J, Sharp FR. Morphine induces c-fos and junB in striatum and nucleus accumbens via D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8537-8541, 1994.
191. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
192. Lupinacci NS, Rikli RE, Jones CJ, Ross D. Age and physical activity effects on reaction time and digit symbol substitution performance in cognitively active adults. *Res Q Exerc Sport* **64**: 144-150, 1993.
193. Mac Rae PG, Spirduso WW, Walters TJ, Farrar RP, Wilcox RE. Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolites in presenescent older rats. *Psychopharmacol* **92**: 236-240, 1987.
194. Maloteaux JM, Gossuin A, Pauwels PJ, Laduron PM. Short-term disappearance of muscarinic cell surface receptors in carbachol-induced desensitization. *Febbs Lett* **156**:103-107, 1983.



195. Mantyh PW, Allen CJ, Ghilardi JR, Rogers SD, Mantyh CR, Lui H, Basbaum AI, Vigna SR, Maggio JE. Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: Substance P-evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *PNAS* **92**:2622-2626, 1995.
196. Marsden CD. The enigma of the basal ganglia and movement. *Trends Neurosci* **3**:284-287, 1980.
197. Marsden CD. The basal ganglia and the control of movement: motor activity and the outputs of the basal ganglia. *Trends Neurosci* **4**: 124-125, 1981.
198. McDonald RJ, White NM. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala and dorsal striatum. *Behav Neurosci* **107**: 3-22, 1993.
199. McDonald RJ, White NM. Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav Neural Biol* **61**: 260-270, 1994.
200. Merzenich MM, Kaas JH, Wall JT, Sur M, Nelson RJ, Felleman DJ. Progression of change following median nerve section in the cortical representation of the hand in areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. *Neuroscience* **10**: 639-665, 1983.
201. Merzenich MM, Nelson RJ, Stryker MP, Cynader MS, Schoppmann A, Zook JM. Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J Comp Neurol* **224**: 591-605, 1984.
202. Micheva KD, Beaulieu C. An anatomical substrate for experience-dependent plasticity of the rat barrel field cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11834-11838, 1995.

203. Miller JC, Friedhoff AJ. Prenatal neuroleptic exposure alters postnatal striatal cholinergic activity in the rat. *Dev Neurosci* **8**: 111-116, 1986.
204. Miller JC, Friedhoff AJ. Prenatal neurotransmitter programming of postnatal receptor function. En: *Progress in Brain Research* **73**: 509-523. Boer GI, Feenstra MGP, Mirmiran M, Swaab DF, Van Haaren F (eds). Elsevier Science Publishers BV, 1988.
205. Mishkin M, Malamut B, Bachevalier J. Memories and habits. En: *Neurobiology of learning and memory*. pg 65-77. Lynch G, McGaugh JI, Weinberger NM (eds). Guilford, New York, 1984.
206. Mobley WC, Woo JE, Edwards RH, Riopelli RJ, Longo FM, Weskamp G, Otteri V, Valleta JS, Johnston MV. Developmental regulation of nerve growth factor and its receptor in the rat caudate-putamen. *Neuron* **3**: 655-664, 1989.
207. Moratalla R, Vickers EA, Robertson HA, Cochran BH, Graybiel AM. Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. *J Neurosci* **13**: 423-433, 1993.
208. Morelli M, Fenu S, Cozzolino A, Pinna A, Carta A, DiChiara G. Blockade of muscarinic receptors potentiates D1 dependent turning behavior and c-fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats but does not influence D2 mediated responses. *Neurosci* **3**: 673-678, 1993.
- 209 Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the Central Nervous System after seizure. *Science* **237**: 192-197, 1987.

210. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann Rev Neurosci* **14**: 421-451, 1992.
211. Morgan ME, Yamamoto BK, Freed CR. Unilateral activation of caudate tyrosine hydroxylase during voluntary circling behavior. *J Neurochem* **43**: 737-741, 1984.
212. Nathanson NM. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Ann Rev Neurosci* **10**:195-236, 1987.
213. Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* **373**: 109, 1995.
214. Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* **726**: 49-56, 1996.
215. Nelsestuen GL, Bazzi MD. Activation and regulation of protein kinase C enzymes. *J Bioenergetics Biomembranes* **23**: 43-61, 1991.
216. Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* **12**: 2439-2450, 1992.
217. Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* **11**: 995-1006, 1993.
218. Nicholson LF, Farrell RL, Waldvogel HJ, Dragunow M. GABA and GABAA receptor changes in the substantia nigra of the rat following quinolinic acid lesions in the striatum closely resembles Huntington's disease. *Neurosci* **66**:507-521, 1995.

219. Nicoll RA, Malenka RC, Kauer JA. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **78**: 513-565, 1990.
220. Nishizuka. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312, 1986.
221. Nonomura T, Hatanaka H. Neurotrophic effect of brain-derived neurotrophic factor on basal forebrain cholinergic neurons in culture from postnatal rats. *Neurosci Res* **14**: 226-233, 1992.
222. Nowak G. Lateralization of neocortical dopamine receptors and dopamine level in normal wistar rats. *Pol J Pharmacol Pharm* **41**:133-137, 1989.
223. Numa S. A molecular view of neurotransmitter receptors and ion channels. *Harvey Lect* **83**: 121-165, 1989.
224. Oberg RGE, Divac I. The basal ganglia and the control of movement: levels of motor planning. Cognition and the control of movement. *Trends Neurosci* **4**: 122-124, 1981.
225. Oertel WH, Mugnaini E. Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci Lett* **47**: 233-238, 1984.
226. Ogawa N, Asanuma M, Kondo Y, Nishibayashi S, Mori A. Reduced choline acetyltransferase activity and muscarinic M1 receptor levels in aged Fisher 344 rat brains did not parallel their respective mRNA levels. *Brain Res* **658**:87-92, 1994.

227. Oka H. Organization of the cortico-caudate projections. A horseradish peroxidase study in the cat. *Exp Brain Res* **40**: 203-208, 1980.
228. Oppenheim RW. Cell death during neural development. En *Handbook of Physiology, Neuronal Development*. Vol 1. Ed. Cowan WM. Washington DC. 1988.
229. Packard MG, Cahill L, McGaugh JL. Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *PNAS* **91**: 8477-8481, 1994.
230. Paratcha GCh, Ibarra GR, Cabrera RJ, Azcurra. Decreased *in vitro* GAP-43/B-50 phosphorylation in rat striatum after circling motor activity. En evaluación en *Neuroreport*.
231. Pardo JV, Creese I, Burt DR, Snyder SH. Ontogenesis of dopamine receptor binding in corpus striatum of the rat. *Brain Res* **125**: 376-382, 1977.
232. Parent A. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci* **13**: 254-258, 1990.
233. Parent A, Hazrati L-N. Functional anatomy of the basal ganglia. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Rev* **20**: 91-127, 1995.
234. Park MR, Lighthall JW, Kitai ST. Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res* **194**: 359-369, 1980.
235. Paulsen JS, Butter N, Salmon DP, Heindel WC, Swenson MR. Prism adaptation in Alzheimer's and Huntington's disease. *Neuropsychol* **7**:73-81, 1993.

236. Penney JB, Young AB. Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Ann Rev Neurosci* **6**: 73-94, 1983.
237. Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, Capon DJ. Distinct primary structures, ligand binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J* **6**: 3923-3929, 1987.
238. Peralta EG, Winslow JW, Peterson GL, Smith DH, Ashkenazi A, Ramachandran J, Schimerlik MI, Capon DJ. Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* **236**: 600-605, 1987.
239. Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran J, Capon DJ. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* **334**: 434-437, 1988.
240. Pérez-Navarro E, Alberch J, Marsal J. Postnatal development of functional dopamine, opioid and tachykinin receptors that regulate acetylcholine release from rat neostriatal slices. Effect of 6-hydroxydopamine lesion. *Int J Devl Neurosci* **11**: 701-708, 1993.
241. Peterson GL, Herron GS, Yamaki M, Fullerton DS, Schimerlik MI. Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 4993-4997, 1984.
242. Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol* **238**: 286-307, 1985.

243. Phelps PE, Brady DR, Vaughn JE. The generation and differentiation of cholinergic neurons in rat caudate-putamen. *Dev Brain Res* **46**: 47-60, 1989.
244. Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol* **34**:1-26, 1995.
245. Platz T, Denzler P, Kaden B, Mauritz KH. Motor learning after recovery from hemiparesis. *Neuropsychologia* **32**: 1209-1223, 1994.
246. Purves D, Lichtman JW. Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science* **210**:153-157, 1980.
247. Pysh JJ, Weiss GM. Exercise during development induces an increase in purkinje cell dendritic tree size. *Science* **206**:230-232, 1979.
248. Qin Z-H, Chen JF, Weiss B. Lesions of mouse striatum induced by 6-hydroxidopamine differentially alter the density, rate of synthesis and level of gene expression of D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurochem* **62**: 411-420, 1994.
249. Ragsdale Jr CW, Graybiel AM. A simple ordering of neocortical areas established by the compartmental organization of their striatal projections. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6196-6199, 1990.
250. Ramón y Cajal S. *Les nouvelles idées sur la structure du système nerveux chez l'homme et chez les vertébrés*. pg 78. Azoulay L (Ed). Edición francesa. Reinwald, Paris, 1895.

251. Rauscher III FJ, Cohen DR, Curran T, Bos TJ, Vogt PK, Bohmann D, Tjian R, Franza RB. Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogen. *Science* **240**: 1010-1016, 1988.
252. Raymond JL, Lisberger SG, Mauk MD. The cerebellum: a neuronal learning machine? *Science* **272**:1126-1131, 1996.
253. Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E. The GABA neurons and their axon terminals in the rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J Comp Neurol* **187**: 261-284, 1979.
254. Richardson RM, Hosey MM. Agonist-independent phosphorylation of purified cardiac muscarinic cholinergic receptors by protein kinase C. *Biochemistry* **29**: 8555-8561, 1990.
255. Richter CP, Wang GH. New apparatus for measuring the spontaneous motility of animals. *J Lab Clin Med* **12**: 289-292, 1926.
256. Robbins TW, Cador M, Taylor JR, Everitt BJ. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neurosci Behav Rev* **13**: 155-162, 1989.
257. Robbins TW, Everitt BJ. Neurobehavioral mechanisms of reward and motivation. *Curr Op Neurobiol* **6**: 228-236, 1996.
258. Robinson RE, Becker JB. The rotational model: assymetry in the effects of unilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra in rats. *Brain Res* **264**: 127-131, 1983.
259. Robner S, Kues W, Witzemann V, Schliebs R. Laminar experssion of m1, m3 y m4 muscarinic cholinergic receptor genes in the developing rat visual cortex using *in situ*



hybridization histochemistry. Effect of monocular visual deprivation. *Int J Devl Neurosci* **11**: 369-378, 1993.

260. Rodier PM, Reynolds SS, Roberts WN. Behavioral consequences of interference with CNS development in the early fetal period. *Teratol* **19**: 327-336, 1979.

261. Rodier PM. Chronology of neuron development: animals studies and their clinical implications. *Dev Med Child Neurol* **22**: 525-545, 1980.

262. Rogers RI, Meyer JS, Mortel KF. After reaching retirement age physical activity sustains cerebral perfusion and cognition. *J Am Geriatr Soc* **38**: 123-128, 1990.

263. Rosenbaum LC, Malencik DA, Anderson SR, Tota MR, Schimerlik MI. Phosphorylation of the porcine atrial muscarinic acetylcholine receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**: 8183-8188, 1987.

264. Roy EJ. Estradiol implants in the rat striatum stimulate locomotor activity in running wheels. *Soc Neurosci Abstr* **13**:224, 1987.

265. Roy EJ, Buyer DR, Licari VA. Estradiol in the striatum: effects on behavior and dopamine receptors but no evidence for membrane steroid receptors. *Brain Res Bull* **25**: 221-227, 1990.

266. Royce GJ. Laminar origin of cortical neurons which project upon the caudate nucleus: a horseradish peroxidase investigation in the cat. *J Comp Neurol* **205**: 8-29, 1982.

267. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* **240**: 1328-1331, 1988.

268. Saint-Cyr JA, Taylor AE, Lang AE. Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. *Brain* **111**: 941-959, 1988.
269. Saint-Cyr JA, Ungerleider LG, Desimone R. Organization of visual cortical inputs to the striatum and subsequent outputs to the pallido-nigral complex in the monkey. *J Comp Neurol* **298**: 129-156, 1990.
270. Sakhi S, Bruce A, Sun N, Tocco G, Baudry M, Schreiber SS. p53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system. *PNAS* **91**:7525-7529, 1994.
271. Salmon DP, Butters N. Neurobiology of skill and habit learning. *Curr Op Neurobiol* **5**: 184-190, 1995.
272. Sane DH, Takacs C. Activity-dependent refinement of inhibitory connections. *Eur J Neurosci* **5**:570-574, 1993.
273. Sauer H, Fischer W, Nikkhah G, Wiegand SJ, Brundin P, Lindsay RM, Bjorklund A. Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. *Brain Res* **626**: 37-44, 1993.
274. Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* **51**: 660-672, 1949.
275. Schlaggar BL, Fox K, O'Leary DDM. Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature* **364**:623-626, 1993.

276. Scherer NM, Nathanson NM. Differential regulation by agonist and phorbol ester of cloned m1 and m2 muscarinic acetylcholine receptors in mouse Y1 adrenal cells and in Yi cells deficient in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **29**: 8475-8483, 1990.
277. Schneider LH, Murphy RB, Coons EE. Lateralization of striatal dopamine (D2) receptors in normal rats. *Neurosci Lett* **33**:281-284, 1982.
278. Schofield PR, Shivers BD, Seeburg PH. The role of receptor subtype diversity in the CNS. *Trends Neurosci* **13**: 8-11, 1990.
279. Schulz W, Apicella P, Ljunberg T. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci* **13**: 900-913, 1993.
280. Schwartz WJ, Gunn RH, Sharp FR, Evarts EV. Unilateral electrolytic lesions of the substantia nigra cause contralateral circling in rats. *Brain Res* **105**:358-361, 1976.
281. Shapiro RA, Scherer NM, Habecker BA, Subers EM, Nathanson NM. Isolation, sequence and functional expression of the mouse M1 muscarinic acetylcholine receptor gene. *J Biol Chem* **263**: 18397-18403, 1988.
282. Shaw CJ, Needler MC, Cynader M. Ontogenesis of muscarinic acetylcholine binding sites in cat visual cortex: reversal of laminar specific distribution during the critical period. *Dev Brain Res* **14**: 295-299, 1984.
283. Sherman SM, Spear PD. Organization of visual pathways in normal and visually deprived cats. *Physiol Rev* **62**: 738-855, 1982.

284. Simon DK, Prusky GT, O'Leary DDM, Constantine-Paton M. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. *PNAS* **89**:10593-10597, 1992.
285. Singer W. Development and plasticity of cortical processing architectures. *Science* **270**:758-764, 1995.
286. Sivam SP, Krause JE, Breese GR, Hong JS. Dopamine-dependent postnatal development of enkephalin and tachykinin neurons of rat basal ganglia. *J Neurochem* **56**: 1499-1508, 1991.
287. Spurzheim JG. *The psysiognomical system of Drs. Gall and Spurzheim*. pgs 554-555. Baldwin, Cradock, Joy (eds). London, 2º edición, 1815.
288. Swaab DP, Boer GJ, Feenstra MGP. Concept of functional neuroteratology and the importance of neurochemistry. *Prog Brain Res* **73**: 3-13, 1988.
289. Taylor JE, El-Fakahany E, Richelson E. Long term regulation of muscarinic acetylcholine receptor on cultured cells. *Life Sci* **25**:2181-2187, 1979.
290. Taylor JE, Yaksh TL, Richelson E. Agonist regulation of muscarinic acetylcholine receptors in rat spinal cord. *J Neurochem* **39**:521-524, 1982.
291. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* **270**: 593- 598, 1995.
292. Tice MAB, Hashemi T, Taylor LA, McQuade RD. Distribution of muscarinic receptor sybtypes in rat brain from postnatal to old age. *Dev Brain Res* **92**: 70-76, 1996.

293. Toran-Allerand CD, Miranda RC, Bentham WDL, Sohrabji F, Brown TJ, Hochberg RB, MacLusky NJ. Estrogen receptors colocalize with low-affinity nerve growth factor receptors in cholinergic neurons of the basal forebrain. *PNAS* **89**:4668-4672, 1992.
294. Tsukahara N. Synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Ann Rev Neurosci* **4**:351-379, 1981.
295. Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* **24**: 485-493, 1970.
296. Usherwood PNR. Memories are made of this. *Trends Neurosci* **16**: 427-429, 1993.
297. Uylings HBM, Kuypers K, Diamond MC, Veltman WAM. Effects of differential environments on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats. *Exp Neurol* **62**:658-677, 1978.
298. Van der Zee EA, Compaan JC, Bohus B, Luiten PGM. Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptors and colocalized PKC gamma in mouse hippocampus induce by spatial discrimination learning. *Hippocampus* **5**:349-362, 1995.
299. Van Huizen F, Strosberg AD, Cynader MS. Cellular and subcellular localisation of muscarinic acetylcholine receptors during postnatal development of cat visual cortex using immunocytochemical procedures. *Dev Brain Res* **44**: 296-201, 1988.
300. Venero JL, Beck KD, Hefti F. Intrastriatal infusion of nerve growth factor after quinolinic acid prevents reduction of cellular expression of choline acetyltransferase

messenger RNA and trkA messenger RNA but not glutamate decarboxylase mRNA. *Neuroscience* **61**:257-268, 1994.

301. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neurosci* **46**: 755-784, 1992.

302. Von Voightlander PF, Moore KE. Turning behavior of mice with unilateral 6-hydroxydopamine lesions in the striatum: effects of apomorphine, L-Dopa, amantadine, amphetamine and other psychomotor stimulants. *Neuropharmacol* **12**: 451-462, 1973.

303. Vorhees CV. Reliability, sensitivity and validity of behavioral indices of neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol* **9**: 445-464, 1987.

304. Waelbroeck M, Tastenoy M, Camus J, Christophe J. Binding of selective antagonists to four muscarinic receptors (m1 to M4) in rat forebrain. *Mol Pharmacol* **38**: 267-273, 1990.

305. Wall SJ, Yasuda RP, Hory F, Flagg S, Martin BM, Ginns EI, Wolfe BB. Production of antisera selective for m1 muscarinic receptors using fusion proteins: distribution of m1 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* **39**: 643-649, 1991.

306. Wall SJ, Yasuda RP, Li M, Wolfe BB. Development of an antiserum against m3 muscarinic receptors: distribution of m3 receptors in rat tissues and clonal cell lines. *Mol Pharmacol* **40**: 783-389, 1991.

307. Wei J, Walton EA, Milici A, Buccafusco JJ. m1-m5 muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC. *J Neurochem* **63**: 815-821, 1994.

308. Weiner DM, Levey AI, Brann MR. Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7050-7054, 1990.
309. Whishaw IQ. Dissociating performance and learning deficits on spatial navigation tasks in rats subjected to cholinergic muscarinic blockade. *Brain Res Bull* **23**:347-358, 1989.
310. Wichmann T, DeLong MR. Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv Neurol* **60**: 53-61, 1993.
311. Wiesel TN. Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature* **299**: 583-591, 1982.
312. Williams RW, Herrup K. The control of neuron number. *Ann Rev Neurosci* **11**:423-453, 1988.
313. Wilson CJ, Groves PM. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **194**: 599-615, 1980.
314. Wise RA. Intracranial self-stimulation mapping against the lateral boundaries of the dopaminergic cells of the substantia nigra. *Brain Res* **213**: 190-194, 1981.
315. Wolansky MJ, Azcurra JM. Prolongation of rat striatum postnatal critical period by NGF. *VI World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Buenos Aires, Agosto 4-9, 1996.

316. Wong EHF, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. The anticonvulsivant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci, USA* **83**: 7104-7108, 1986.
317. Woolf N. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* **37**: 475-524, 1991.
318. Woosley TA, Van der Loos H. Structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* **17**: 205-242, 1970.
319. Wurtman RJ. Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. *Trends Neurosci* **15**:117-122, 1992.
320. Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expresion of dynorphin and in dopamine mediated behavioral responses. *Cell* **79**: 729-742, 1994.
321. Yamamoto BK, Freed CR. The trained circling rat: a model for inducing unilateral caudate dopamine metabolism. *Nature* **298**: 467-468, 1982.
322. Yamamoto BK, Freed CR. Regional brain dopamine metabolism: A marker for the speed, direction and posture of moving animals. *Science* **229**:62-65, 1985.
323. Yamamura H, Snyder SH. Muscarinic cholinergic binding in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 1725-1729, 1974.
324. Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ. Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1291-1295, 1991.



325. Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10037-10041, 1991.

## TRABAJOS PUBLICADOS

Los siguientes trabajos contienen experimentos que forman parte de la presente Tesis:

- ◇ Permanent alteration of muscarinic acetylcholine receptor binding in rat striatum following circling training during a limited period of striatal development. **Ibarra GR**, Rodriguez JA, Paratcha GCh, Azcurra JM. *Brain Research* **705**: 39-44, 1995.
- ◇ Coalteration of Dopamine D2 receptor and muscarinic acetylcholine receptor binding in rat striatum after circling training. **Ibarra GR**, Paratcha GCh, Wolansky MJ, Azcurra JM. *Neuroreport* **7**: 2491-2494, 1996.
- ◇ Altered expresión of M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptor after circling training in rat striatum assessed by RT-PCR. Ibarra GR, Werbahj SE, Paratcha GCh, Azcurra JM. En preparación.
- ◇ Muscarinic acetylcholine receptor alteration in rat brain after circling training. Ibarra GR, Paratcha GCh, Azcurra JM. En preparación.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Julio Marcos Azcurra por los años de investigación en el laboratorio de Biología Celular. Los consejos recibidos y las ideas que crecieron a partir de largas jornadas de trabajo fueron fundamentales para lograr disfrutar de la mejor herramienta que puede ofrecerme la experiencia científica, aprender a pensar.

Este trabajo no habría sido posible sin la magra colaboración del CONICET, UBA y Fundación Antorchas.

A los compañeros de «lucha»: Gustavo Paratcha, Elsa Meinardi, Marcelo Wolansky, Ricardo Cabrera, Corina von Waveren, Emi Arndt. Quizás ellos más que nadie pueden comprender lo que significa llegar hasta acá.

En particular quiero recordar a Jorge Rodríguez y Gustavo Paratcha por compartir muchos de los sabores y angustias de la ciencia. A Santiago Werbahj que con su paciencia y esfuerzo colaboró en esta odisea. También a Patricia Berninsone, una «vieja jefa», de las buenas.

Aunque nunca entendieron muy bien qué significaba esto, no quiero olvidar ahora a tres amigos de toda la vida: Gabriel, Federico y Victor.

Un recuerdo especial para el YATE que más de una vez fue un estímulo para comenzar un experimento.

Los últimos tres agradecimientos tienen un significado mucho más especial de lo que pueden imaginar:

A mi familia, los que siempre están sin preguntar. Los que no exigen metas pero disfrutan cuando las alcanzo. En especial a mi viejo, estoy seguro que sabe valorar este momento. En especial a mi vieja, estoy seguro que va a disfrutar mi alegría.

Cómo agradecerlo. Luchó, empujó, padeció y lo esperó codo a codo. Compartió más que nadie. Como tantas otras cosas, lo disfrutamos juntos. Para vos Nan.

Para alguien muy especial, la estamos esperando...

*Brindo por esto,  
me lo tenía prometido.*

neurofarmacológica de estimulantes psicomotores como la cocaína y la anfetamina (105, 161, 217).

Finalmente, el registro electrofisiológico de las neuronas estriatales durante el comportamiento motor sustenta la idea de la su participación en los procesos relacionados con dicha actividad (107, 196). Además el cuerpo estriado fue la primera estructura donde se demostró una modificación neuroquímica específica luego de la estimulación motora; la activación de la tirosina hidroxilasa, una enzima limitante de la síntesis de dopamina (211).

### **1.3.3. Procesos de aprendizaje y memoria**

Por mucho tiempo, el interés experimental en el cuerpo estriado estuvo relacionado con su participación en el control de la respuesta motora, sin sospecharse que la misma estructura pudiera estar relacionada con procesos de aprendizaje y memoria. Si bien fueron halladas alteraciones de estas últimas funciones nerviosas en pacientes con fisiopatologías motoras, en un principio se pensó que su observación estaba relacionada con la degeneración progresiva de otros centros nerviosos, y no con una vinculación directa del cuerpo estriado en funciones cognitivas.

Sin embargo, con el tiempo fueron acumulándose evidencias que transformaron al cuerpo estriado en una estructura mucho más compleja que lo sospechado inicialmente. El descubrimiento de patrones de disparo neuronal relacionados con memoria en la sustancia nigra pars reticulata, una estructura receptora de fibras estriatales, abrió el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria en el cuerpo estriado (127). Diversas investigaciones, la mayoría de ella en seres humanos, muestran la importancia del sistema corticoestriatal en el aprendizaje motor y la memoria implícita involucrada en la adquisición de habilidades cognitivas, perceptuales y motoras (54, 268, 271), así como en el desarrollo de hábitos de estímulo-respuesta (205, 271).