



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Plasticidad Sináptica Dependiente de Actividad
del Receptor NMDA en Cuerpo Estriado de Rata
durante el Desarrollo Postnatal***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Autora: Lic. Mariana Fossati

Director: Dr. Julio Marcos Azcurra

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Buenos Aires, Noviembre de 2008

Plasticidad Sináptica Dependiente de Actividad del Receptor NMDA en Cuerpo Estriado de Rata durante el Desarrollo Postnatal

RESUMEN

Glutamato es el neurotransmisor excitatorio esencial en el cuerpo estriado, la región principal de los ganglios basales y área clave para la regulación del comportamiento motor. Los receptores NMDA pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos de glutamato y tienen un rol establecido en la regulación del comportamiento motor por los ganglios basales. Las propiedades funcionales de los receptores NMDA dependen de la composición de sus subunidades. Durante el desarrollo, variaciones en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B están relacionadas al período crítico de plasticidad visual en la corteza. El presente estudio fue realizado para investigar el patrón ontogenético de los receptores NMDA en estriado de rata abarcando el período crítico estriatal para la plasticidad motora. El número de receptores NMDA ($B_{\text{máx}}$ de [^3H]MK-801) y la expresión del RNAm de NR1, NR2A y NR2B fueron comparados en un mismo estudio. Estos resultados indican que hay un cambio dinámico en el número de receptores NMDA durante el desarrollo postnatal y esas variaciones se correlacionan con el patrón diferencial de la expresión de las subunidades.

Previamente se ha demostrado un período crítico de plasticidad sináptica dependiente de actividad durante el desarrollo postnatal del cuerpo estriado de rata (PN 30-37). En este período, la estimulación motora en un test de entrenamiento circular (TEC) indujo cambios plásticos permanentes y transitorios en el sistema colinérgico-dopaminérgico. Las aferencias glutamatérgicas representan la llegada cortical principal al estriado y tienen una maduración previa a las neuronas colinérgicas-dopaminérgicas. Considerando ésto, en este nuevo estudio el TEC fue realizado durante los días PN 20-27, 30-37 y 40-47 para investigar los efectos de la estimulación motora en los receptores NMDA. Los resultados demuestran una significativa disminución en el número de receptores NMDA y en la expresión del RNAm de sus subunidades exclusivamente en animales entrenados durante PN 20-27. A nivel sináptico este efecto se correlaciona con una reducción de la proteína postsináptica PSD-95, mientras que la proteína Sinaptofisina no se modificó en todos los grupos experimentales. Estas observaciones aportan evidencias de un ajuste sináptico

dependiente de actividad previo al periodo crítico de las fibras colinérgicas-dopaminérgicas indicando la existencia de múltiples periodos de ajuste sináptico dependiente de actividad.

Palabras clave: NMDA, cuerpo estriado, desarrollo, plasticidad, actividad motora, periodo crítico.

Activity Dependent Synaptic Plasticity of NMDA Receptor in Rat Striatum during Postnatal Development

ABSTRACT

Glutamate is the principal excitatory neurotransmitter in the striatum, the main region of the basal ganglia and a key site for the regulation of motor behavior. NMDA receptors are one of the major classes of ionotropic glutamate receptors and they have an established role in the regulation of motor behavior by the basal ganglia. Functional properties of NMDA receptors are dependent on their subunit composition. Developmental changes in the expression of NR1, NR2A and NR2B subunits are related to visual critical period plasticity in cortex. The present study was performed to investigate the ontogenetic patterns of NMDA receptors in rat striatum including the striatal critical period for motor plasticity. Thus, NMDA receptor number (B_{\max} of [^3H]MK-801) and NR1, NR2A and NR2B mRNA expression were compared in a single study. The present results indicate that there is a dynamic change in NMDA receptor number during postnatal development and that these variations are correlated to differential patterns of subunits expression.

Previously it has been shown a critical period for activity-dependent synaptic plasticity during rat striatum postnatal development (PN 30-37). In this period, motor stimulation in a circling training test (CT) triggered permanent and transient plastic changes in the cholinergic-dopaminergic system. Glutamatergic afferences represent the primary cortical input to striatum and have an activity maturation prior to cholinergic-dopaminergic neurons. With this in mind, in this new study, CT was performed during PN 20-27, 30-37 and 40-47 to investigate the effects of motor activity on NMDA receptors. These results demonstrate a significant decrease in NMDA receptor number and mRNA subunits expression of trained animals exclusively during PN 20-27. At the synaptic level this effect correlates with postsynaptic PSD-95 protein reduction whereas striatal Synaptophysin protein remained unchanged in all experimental groups. These observations provide evidence of an activity dependent synaptic adjustment prior to critical period of the modulatory cholinergic-dopaminergic fibers evidencing the existence of multiple periods of activity dependent synaptic adjustment.

Key words: NMDA, striatum, development, plasticity, motor activity, critical period.

A mis padres, a Nicolás.

*Es mejor saber después de haber pensado y discutido
que aceptar los saberes que nadie discute
para no tener que pensar.*

Fernando Sabater

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: UNA ESTRUCTURA PLÁSTICA	1
1.1.1. Sistema Nervioso Central: desarrollo y plasticidad neuronal	1
1.1.2. Avance de la plasticidad en el Sistema Nervioso Central	2
1.1.3. Algunos modelos para el estudio de la plasticidad	4
1.1.4. Estimulación motora y plasticidad motora	7
1.1.5. Los mecanismos plásticos y la importancia de los neuroreceptores	8
1.1.6. Importancia del estudio de la plasticidad durante el desarrollo	9
1.2. PERÍODOS CRÍTICOS	10
1.2.1. Períodos críticos durante el desarrollo	10
1.2.2. Pre-período crítico para la plasticidad en corteza visual	11
1.2.3. Regulación de períodos críticos	12
1.2.4. Determinantes de períodos críticos	15
1.2.5. La matriz extracelular y la plasticidad visual	17
1.3. ACTIVIDAD MOTORA Y SU IMPLICANCIA EN LA PLASTICIDAD	18
1.3.1. Sistemas motores	18
1.3.2. Actividad motora	19
1.3.3. Inducción de mecanismos plásticos por la actividad motora	21
1.3.4. Pruebas para el análisis comportamental	21
1.3.5. Comportamiento motor	22
1.3.6. Entrenamiento rotatorio e inducción de cambios plásticos	23
1.3.7. El Test de Entrenamiento Circular (TEC)	24
1.4. EL CUERPO ESTRIADO EN EL ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD	25
1.4.1. El cuerpo estriado como área de estudio	25
1.4.2. El cuerpo estriado y la actividad motora	26
1.4.3. Procesos de aprendizaje y memoria	28
1.4.4. Mecanismos de recompensa y motivación	30
1.4.5. El cuerpo estriado, los mecanismos plásticos y su importancia clínica	30
1.5. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DEL CUERPO ESTRIADO	32
1.5.1. Anatomía funcional y organización estructural	32
1.5.2. Composición celular	35
1.5.3. Conexiones extrínsecas e intrínsecas sobre la neurona estriatal gabaérgica proyectiva	38
1.5.4. El sistema colinérgico-dopaminérgico	39
1.5.5. Aspectos neuroquímicos	40
1.5.6. Desarrollo del cuerpo estriado	41
1.6. RECEPTOR DE GLUTAMATO TIPO NMDA Y PLASTICIDAD SINÁPTICA ESTRIATAL	43
1.6.1. Plasticidad sináptica corticoestriatal	43
1.6.2. Receptores de glutamato	44
1.6.3. El receptor NMDA: estructura, localización y farmacología	45
1.6.4. El receptor NMDA y actividad motora	47
1.6.5. Plasticidad y expresión diferencial de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo postnatal	48
1.6.6. Moléculas de transducción de señales en la sinápsis glutamatérgica	51

1.7. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	53
2. METODOLOGÍA	54
2.1. ANIMALES	55
2.1.1. Animales utilizados	55
2.1.2. Mantenimiento de los animales	55
2.2. ENTRENAMIENTO	54
2.2.1. Test de Entrenamiento Circular (TEC)	54
2.2.2. Protocolo de Entrenamiento	55
2.2.3. Animales controles	57
2.2.4. Criterios de descarte	57
2.3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS	58
2.3.1. Disección del cuerpo estriado	58
2.3.2. Fraccionamiento subcelular para determinaciones neuroquímicas	59
2.3.2.1. Determinación de proteínas	60
2.3.3. Extracción de RNA	60
2.4. MEDICIÓN DE NEURORECEPTORES	61
2.4.1. Ensayos de unión de [³ H]MK-801 a los receptores NMDA	61
2.4.1.1. Determinación del número	61
2.4.1.2. Determinación de la afinidad	62
2.4.2. Cálculo de B _{máx} y K _d	62
2.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RNAm DEL NMDAR MEDIANTE RT-PCR	63
2.5.1. Síntesis de DNA copia (cDNA)	63
2.5.2. Secuencias de los primers para PCR	64
2.5.3. RT-PCR de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del NMDA	64
2.5.4. Separación del producto de RT-PCR mediante electroforesis	65
2.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS	66
2.6.1. Western blot de PSD-95 y Sinaptofisina	66
2.8. SEMICUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR Y WESTERN BLOT	67
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
3. RESULTADOS	69
3.1. PROCESAMIENTO DEL CUERPO ESTRIADO PARA ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS	69
3.1.1. Disección y fraccionamiento subcelular: medición del peso del tejido y concentración de proteínas	69
3.1.2. Extracción de RNA: rendimiento, pureza e integridad	71
3.2. ONTOGENIA DEL RECEPTOR NMDA EN CUERPO ESTRIADO	75
3.2.1. Medición de los receptores NMDA mediante ensayos de unión a ligando	75
3.2.2. Expresión de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo	76
3.2.2.1. Puesta a punto y elección de ciclos de amplificación	77

3.2.2.2. Expresión del RNAm de NR1, NR2A y NR2B	79
3.3. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO A DISTINTAS EDADES SOBRE EL RECEPTOR NMDA	83
3.3.1. Efectos del test de entrenamiento circular (TEC): reducción del número de receptores NMDA	83
3.3.2. Efectos del test de entrenamiento circular (TEC): disminución de la expresión de las subunidades del receptor NMDA	84
3.4. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE PROTEÍNAS PRE Y POSTSINÁPTICAS	89
3.4.1. Disminución de la expresión de PSD-95 en animales entrenados a los 20 días de edad	89
4. DISCUSIÓN	94
4.1. ONTOGENIA DEL RECEPTOR NMDA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL CUERPO ESTRIADO	94
4.1.1. Cambio en el número de receptores NMDA durante el desarrollo postnatal	94
4.1.2. Cambio en la composición de las subunidades del receptor NMDA durante el desarrollo	95
4.1.2.1 Diferencias en la expresión de la inmunoreactividad de las subunidades	97
4.1.2.2 Cambio en la composición de las subunidades del receptor NMDA en las neuronas espinosas medianas durante el desarrollo	99
4.1.2.3 Las interneuronas estriatales expresan diferentes subunidades del receptor NMDA durante el desarrollo	100
4.1.3. Consideraciones fisiológicas	101
4.2. EFECTOS DEL TEC EN LA SINÁPSIS GLUTAMATÉRGICA DEL CUERPO ESTRIADO	103
4.2.1. Disminución del número de receptores NMDA en animales entrenados a los 20 días postnatales	103
4.2.1.1. Posibles causas para la reducción de receptores NMDA	106
4.2.1.2. Receptores de glutamato y su participación en LTP y LTD	108
4.2.2. Reducción de las subunidades del NMDAR en animales entrenados a los 20 días postnatales	110
4.2.3. El efecto del TEC sólo se evidencia cuando se realiza a los 20 días postnatales	112
4.2.4. Efecto a largo plazo inducido por el TEC	113
4.2.5. Analogía con el pre-período crítico visual	114
4.2.6. Efectos del TEC en proteínas sinápticas: Cambios en la expresión de PSD-95 pero no de Sinaptofisina	115
4.2.7. Consideraciones biológicas y conclusiones finales	118
5. REFERENCIAS	121

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: UNA ESTRUCTURA PLÁSTICA

1.1.1. Sistema Nervioso Central: desarrollo y plasticidad neuronal

El Sistema Nervioso Central (SNC) es una estructura de extraordinaria complejidad, se compone de circuitos sinápticos precisos en los cuales participan cientos de miles de neuronas que permiten el control y ejecución de funciones vegetativas, la percepción y procesamiento de los estímulos sensoriales, la respuesta motora y las emociones como así también el aprendizaje y almacenamiento de la memoria. El patrón de conexiones sinápticas que da lugar a tal diversidad de funciones superiores se forma durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano siguiendo pautas establecidas por un programa genético específico (Goodman y Shatz 1983, Tessier-Lavigne y Goodman 1996). En este proceso también es fundamental la actividad sináptica mediante la cual se establecen los patrones de conectividad neuronal adecuados durante el desarrollo postnatal temprano (Franck 1987, Sanes y Takacs 1996), cuya interferencia puede modificar la capacidad funcional del sistema nervioso (Rodier y col. 1979). La actividad neuronal determina la distribución y cantidad de células y moléculas, permitiendo de esta manera el remodelamiento de sinapsis y ramificaciones, el ajuste de neuroreceptores y neurotransmisores. Es de esta manera, como se define el patrón de conectividad final (Franck 1987, Goodman y Shatz 1993, Singer 1995).

Durante el desarrollo se generan sinapsis “inapropiadas” que van desapareciendo mientras se consolidan aquellas que son “apropiadas”, este proceso es acompañado por una abundante transmisión sináptica (Shatz y Kirkwood 1984). Así, la formación del patrón adulto de conexiones involucra la

eliminación de un número limitado de conexiones inmaduras en sitios inapropiados acoplada con la elaboración y adición de nuevas conexiones en sitios apropiados (Katz y Shatz 1996). Este remodelamiento que está acoplado a la actividad funcional y provee adaptación ante cambios externos, es denominado **plasticidad funcional** e indica “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” (Cotman y Sanpedro 1984), o “cualquier cambio persistente en las propiedades funcionales de una neurona o de un grupo funcional” (Tsukahara 1981). En el adulto, esta plasticidad es un fenómeno que abarca la base celular y molecular del aprendizaje y la memoria como una propiedad fundamental del SNC desarrollada durante la evolución (Dudai 1989).

1.1.2. Avance de la plasticidad en el Sistema Nervioso Central

El SNC de los mamíferos, que comienza a conformarse prenatalmente intrauterino, muestra al nacimiento una considerable inmadurez y plasticidad. Esta plasticidad del SNC está presente durante toda la vida, pero es mayor durante el desarrollo y va disminuyendo mientras se produce el envejecimiento. Este concepto es concordante 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. Esto se observa 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. A partir de esta consideración, es posible entender por qué las noxas que interfieren con el desarrollo normal del SNC pueden producir, durante esta etapa, cambios permanentes y 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 fenómenos plásticos son necesarias para mantener, refinar y completar el circuito adulto. Es durante los primeros estadios postnatales que interaccionan procesos que permiten combinar y modificar la organización celular y molecular desarrollada a partir de un programa prefijado para la adaptación a las condiciones del entorno.

De esta manera, durante el desarrollo del SNC se diferencian dos etapas que se pueden solapar en tiempo y espacio: en una primera etapa interviene un **desarrollo genéticamente programado**, el cual incluye proliferación, migración neuronal, agregación celular selectiva, determinación de características morfológicas y neuroquímicas (adquisición de nuevas propiedades de membrana, selección del tipo de transmisión sináptica) y patrones generales de conectividad. Produciéndose por último, el refinamiento estructural del SNC con la competencia por factores tróficos, eliminación de sinapsis y muerte celular programada (Jacobson 1978, Cowan y col. 1984, Williams y Herrup 1988, Klose y Bentley 1989).

En una segunda etapa (postnatal temprana) se produce el **desarrollo funcional**, donde resulta fundamental la interacción del organismo con su medio. La reorganización de las conexiones es función de la actividad, el factor ambiental en contraposición al genético. En este momento, el trazado organizativo general ya está establecido, pero debe madurar. El factor ambiental determina el refinamiento morfológico, cantidad y distribución de células y moléculas, rearreglo de sinapsis y ramificaciones que definen el patrón de conectividad. Por último, el ajuste de la densidad de neuroreceptores y neurotransmisores determina la adaptación fina del sistema (Franck 1987, Lipton y Kater 1989, Goodman y Shatz 1993). Es durante esta etapa donde se manifiestan los eventos plásticos.

Uno de los primeros en poner en evidencia dichos procesos plásticos han sido Bennett y colaboradores quienes mostraron entre 1962 y 1964 que el efecto de colocar ratas adultas durante 80 días en un ambiente complejo y estimulante

puede influir sobre la organización morfológica y neuroquímica del cerebro (Bennett y col. 1964). En estos trabajos se describe por primera vez el concepto de plasticidad cerebral. Estos investigadores manifestaron que la corteza somatosensorial de los animales estimulados tenía un peso 10% superior que los controles mantenidos en sus jaulas. Bajo el mismo diseño experimental otros estudios sugirieron que estos cambios podrían estar asociados al recambio, eliminación y remodelación de las conexiones sinápticas, ya que 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 (Uylings y col. 1978). Poco tiempo después, otros investigadores demostraron que la actividad motora aumentaba el árbol dendrítico de las células de Purkinje (Pysh y Weiss 1979).

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 (Hubel y Wiesel 1962), iniciando el desarrollo de lo que más tarde fue reconocido como el primer modelo, y hasta el momento el más desarrollado, de plasticidad dependiente de actividad 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 (Wiesel 1982). 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, cambiando desde entonces la visión que se tenía sobre el papel de la interacción con el medio ambiente en el desarrollo postnatal del cerebro.

1.1.3. Algunos modelos para el estudio de la plasticidad

En las últimas décadas el desarrollo de distintos modelos experimentales favoreció el estudio de los mecanismos básicos operantes en los procesos neuroquímicos subyacentes en los procesos plásticos.

Los modelos más amplios y descriptivos desarrollados en la investigación de la plasticidad del SNC involucran 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. Hace más de 40 años, Hubel y Wiesel, investigaron en experimentos con gatos y también con monos Rhesus, el efecto de la privación monocular en la dominancia ocular (OD) de neuronas de la corteza visual. Específicamente, demostraron que la privación monocular por sutura de un ojo, generaba un cambio drástico en la distribución de la dominancia ocular de neuronas corticales a favor del ojo no privado, evidenciado como ceguera del ojo privado de estimulación lumínica (Hubel y Wiesel 1965). También demostraron que este efecto sólo se producía en un *período específico* del desarrollo. De esta manera, la ceguera se evidenciaba luego de la privación de experiencia visual durante cortos períodos del desarrollo postnatal pero no en animales adultos (Le Vay y col. 1972, Wiesel 1982). Posteriormente, el defecto visual debido a la privación fue correlacionado con una alteración de la organización estructural de la corteza visual (Wiesel 1982). Distintos estudios complementarios, confirmaron la alteración morfológica de la arborización axónica en el núcleo geniculado lateral y de las arborizaciones tálamo-corticales (Hubel y Wiesel 1968, Garraghty y Sur 1993, Cramer y Sur 1995).

Es a partir de estos estudios que se ha logrado establecer la existencia de una etapa de máxima plasticidad durante el desarrollo postnatal temprano en la cual se pueden generar cambios permanentes en la capacidad funcional del SNC. Dicho fenómeno sólo es evidente cuando se interviene durante un período específico del desarrollo, a dicho período se lo denominó **período crítico** (Katz y Shatz 1996, Hubel y Wiesel 1998). Este período crítico visual de mamíferos, pone en evidencia el efecto de la privación monocular sobre la dominancia ocular de las neuronas corticales, y ha sido bien caracterizado en mono, gato, rata, ratón, y humano (Banks y col. 1975, Olson y Freeman 1980, Fagiolini y col. 1986, Harwerth 1986, Huang 1999).

Un segundo modelo corresponde al estudio de los cambios plásticos en las áreas cortico-sensoriales táctiles luego de la eliminación 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 (Kaas 1983, Sherman y Spear 1982). Ciertos autores han evaluado la representación en la corteza sensorial de las sensaciones táctiles de los dedos de la mano en la **corteza cerebral de primates** (Merzenich y col. 1983, 1984). 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** (Micheva y Beaulieu 1995). Cada bigote del animal está representado en la corteza somatosensorial contralateral en una agregación neuronal independiente denominada barril (Woolsey y Van der Loos 1970), fácilmente visualizable histoquímicamente por la detección de citocromo oxidasa (Land y Simons 1985). Los experimentos de denervación de estas estructuras muestran alteraciones del neuroreceptor colinérgico muscarínico, de las sinapsis GABAérgicas y de la actividad de la acetilcolinesterasa (Glazewski y col. 1990, Micheva y Beaulieu 1995).

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 notorias alteraciones neuroquímicas y morfológicas.

1.1.4. Estimulación motora y plasticidad motora

Además del modelo de estimulación sensorial para el estudio de plasticidad del SNC existen otros tipos de estimulación como es el caso de 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 aferencias y no sólo las aferencias como en los sistemas sensoriales. Por otra parte, el sistema motor presenta características de integración y funcionamiento más complejas y diferentes al sistema visual. Debido a la complejidad del manipuleo y análisis de la experiencia motora, existen prácticamente muy pocos 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** por la amputación de los dígitos (Merzenich y col. 1983, 1984) 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.

Otro 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 (Purves y col. 1980). De este modo, comenzó a comprenderse los eventos neuroquímicos y neurofisiológicos que participan en la determinación del patrón de conectividad sináptica. Hace casi una década, Colman y colaboradores estudiando la inervación del músculo trapecoidal del ratón, comprobaron la existencia de cambios específicos que preceden a la eliminación de una sinapsis (Colman y col. 1997). 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, una conexión aumentó su fortaleza

sináptica mediante el incremento de neurotransmisor liberado, la otra fue tornándose débil debido a una reducción del cuanto de liberación de neurotransmisor y 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 (Cotman y col. 1981).

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 (Schofield y col. 1990). 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. 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 (Rodier y col. 1979, 1980, Swaab y col. 1988). La respuesta plástica diferencial de este período es también indicadora, de la presencia de ciertas características distintivas que no se encuentran presente en otras etapas de la vida postnatal, y por ende, 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 deficiencias motoras 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 evaluada como un factor beneficioso y abre la posibilidad de nuevas aplicaciones terapéuticas (Lenn 1987). En ambos casos, tanto para evitar consecuencias desfavorables como para revertir alteraciones previas, es imprescindible la compensación de los mecanismos plásticos presentes durante el desarrollo.

1.2. PERÍODOS CRÍTICOS

1.2.1. Períodos críticos durante el desarrollo

Aunque el aprendizaje es posible a lo largo de toda la vida, no hay duda que aquel organismo que comienza más joven lo hace mejor y que la plasticidad es aumentada durante ventanas específicas de oportunidad, **períodos críticos**. La experiencia durante estos períodos es esencial para el desarrollo normal de los organismos y modifica de manera permanente la performance de los mismos (Hensch 2005).

La existencia, durante el desarrollo temprano, de **períodos críticos** para la plasticidad dependiente de actividad ha sido demostrada para los sistemas: visual, somatosensorial y también auditivo. Estos períodos críticos también existen para otras funciones, incluyendo el canto en los pájaros y el lenguaje en humanos (King y col. 1991, Buonomano y Merzenich 1998, Doupe y Jul 1999). Ya que el período crítico es una etapa definida en la vida de un animal consagrado a la formación de conexiones neuronales, se ha demostrado para el período crítico visual que cuanto más largo es el tiempo de vida, más largo es el período crítico. También, que existe una relación entre el período crítico y el peso del cerebro, puesto que si se asume que el peso del cerebro es una medida de la complejidad cerebral, el cerebro más complejo se correlaciona con el período crítico más extenso (Berardi y col. 2000). Durante el período crítico, las funciones sensoriales alcanzan la madurez, por ejemplo, la finalización del período crítico para la deprivación monocular coincide con la terminación del desarrollo de agudeza visual en un gran número de especies. Esto indica que la

plasticidad dependiente de actividad durante el período crítico está cercanamente interconectada con la maduración de las funciones sensoriales (Berardi y col. 2000).

Sólo durante el desarrollo temprano la deprivación monocular total puede llevar a cambios compensatorios en otras modalidades. Por ejemplo, se ha demostrado que humanos con ceguera temprana localizan fuentes de sonidos mejor que aquellos con visión (Lessard y col. 1998). Esta capacidad puede ser subordinada por la expansión de inputs auditivos a áreas visuales “no utilizadas” y el mejoramiento del ajuste espacial de neuronas auditivas, como se ha observado en gatos deprivados en ambos ojos (Rauschecker 1995). Una expansión de inputs táctiles a la corteza visual primaria también ha sido demostrada en humanos con ceguera temprana pero no tardía (Sadato y col. 1996). Además, se ha descubierto un mejoramiento de la detección de movimiento en personas con sordera congénita, pero sólo en el campo visual periférico (Neville y Lawson 1987).

1.2.2. Pre-período crítico para la plasticidad en corteza visual

En estos estudios clásicos de plasticidad en corteza visual se describió al período crítico como el tiempo durante el cual el cerrado transiente de un ojo puede alterar la estructura de las columnas de dominancia ocular (CDO). También se sugiere que dicho período corresponde al tiempo en el cual estas columnas son moldeadas a partir de proyecciones tálamo-corticales.

Actualmente se conoce que estas CDO se forman a partir de la entrada de los axones talámicos a la corteza visual y hasta el inicio del período crítico para la deprivación monocular. De esta manera se puede definir el “**pre-período crítico**” con el comienzo de la entrada de los axones talámicos a la corteza (antes de la apertura del ojo) hasta el inicio del período crítico (días a semanas después de la apertura del ojo, dependiendo de las especies); (Feller y Scanziani 2005).

Es también durante este pre-período crítico para la dominancia ocular que pequeños cambios en las cantidades relativas de excitación e inhibición pueden alterar marcadamente el procesamiento de la información. Este delicado

balance está dinámicamente ajustado por los circuitos en las capas corticales donde las conexiones inhibitorias se desarrollan más tardíamente que las conexiones excitatorias (Liu 2004, Long y col. 2005). La manipulación durante el pre-período crítico puede afectar tanto la actividad evocada visualmente como la espontánea.

Un interrogante que surge de lo mencionado es, por qué la existencia de un pre-período crítico y un período crítico?. Una posibilidad sería que el pre-período crítico permite la formación gruesa de mapas, la cual es previa y distinta de los mapas más finos. El período crítico, con su alta sensibilidad a la actividad evocada visualmente, permitiría el refinamiento de esos mapas pre-formados acorde a la experiencia visual de cada animal.

1.2.3. Regulación de períodos críticos

Como se mencionó anteriormente, un período crítico es una etapa de sensibilidad en la cual las propiedades neuronales son particularmente susceptibles a ser modificadas por la experiencia. Aunque los períodos críticos han sido bien documentados para los sistemas sensoriales, este concepto está siendo utilizado ampliamente para muchos tipos de aprendizaje sin una rigurosa demostración de la existencia de esa etapa. Se han identificado principios clave que emergen del estudio y regulación de conocidos períodos críticos. Aunque, al momento, la profundidad del estudio en cada área varía ampliamente, los fundamentos de una teoría general son evidentes (Hensch 2004).

- I) Competencia funcional entre inputs. La especificación genética determina la mayor parte de la estructura básica y funcionamiento del sistema nervioso. Un proceso mediante el cual las neuronas seleccionan su repertorio permanente de inputs (o mapas) de una amplia gama de posibilidades, es requerido para un apropiado funcionamiento del cerebro. Por cierto, el molde de circuitos

neuronales establecido para cada individuo es el principal propósito de los periodos críticos.

- II) Rol particular de la actividad eléctrica. Las neuronas se comunican por la transmisión de impulsos nerviosos como un reflejo de estímulos externos o internos. Los diferentes inputs desde los cuales el sistema nervioso puede elegir durante el período crítico, son finalmente decodificados en la descarga de potenciales de acción. La mayoría de los modelos celulares de plasticidad están basados en la capacidad de potenciar o disminuir la transmisión en las sinapsis individuales a través de su patrón de activación.
- III) Consolidación estructural de las vías seleccionadas. La experiencia temprana especifica un compromiso neuronal a uno de los posibles patrones de conectividad. La magnitud y permanencia de cambios anatómicos, desde la movilidad de espinas dendríticas a reconexiones a gran escala, distinguen la plasticidad del desarrollo del aprendizaje en el adulto. Un período crítico puede ser definido en sistemas donde la modificación estructural se torna esencialmente irreversible más allá de cierta edad. El crecimiento continuo mantiene la sensibilidad para la influencia ambiental a lo largo de la vida.
- IV) El comienzo y duración de la regulación del período crítico no simplemente por la edad sino por la experiencia. Si la apropiada activación neuronal no se produce, entonces los circuitos en desarrollo permanecen en un estado de espera hasta que el input apropiado esté disponible. Alternativamente, ambientes enriquecidos pueden prolongar la plasticidad. En otras palabras, el período crítico es uso-dependiente. Comprendiendo el mecanismo celular de este efecto, ciertas estrategias podrán influenciar la duración del aprendizaje.
- V) Medida y duración de los periodos críticos a través de los sistemas. No todas las regiones del cerebro se desarrollan con el mismo patrón temporal, hay gradientes de maduración y niveles de procesamiento de información. Intuitivamente, el período crítico para una etapa no puede comenzar al menos que su input de otra etapa precedente esté

listo. Cascadas de períodos críticos y su secuencia acumulativa a diferentes edades y niveles de procesamiento, moldean cada función del cerebro mientras que la vía neuronal relevante se desarrolla a un punto donde puede mantener la plasticidad.

- VI) Mecanismos moleculares a lo largo de sistemas o incluso en varias etapas a lo largo de la misma vía. Simplemente, siendo regulado por la actividad neuronal en el cerebro neonato, o contribuyendo a modelos de plasticidad no se establece automáticamente un rol molecular en el período crítico. Los mediadores de plasticidad varían para conexiones individuales y dificultan la búsqueda de factores de plasticidad canónicos. Además, la formación inicial de mapas durante la ontogenia puede utilizar diferencialmente moléculas del remodelado neuronal de circuitos establecidos.
- VII) Rol particular para la inhibición en el SNC. Salvo raros casos en los que los inputs competitivos directamente inciden sobre la misma célula, la mayoría de los circuitos neuronales en el cerebro están intrincadamente interconectados. En esas redes las interneuronas inhibitorias emergen rápidamente como un determinante de la plasticidad neuronal. De hecho, ellas pueden contribuir al encendido/apagado o expresión de períodos críticos en el cerebro.
- VIII) Influencia de la atención y motivación. Como un maestro puede confirmar, la atención en una clase es tal vez el determinante más crítico de si el aprendizaje ocurre o no; entonces también a nivel neuronal, donde el estado activo es traducido al nivel de transmisión aminérgica y colinérgica. Esos sistemas moduladores pueden estar más activamente acoplados en el cerebro infantil, permitiendo la plasticidad no observada en adultos. Mecanismos atencionales incentivos ofrecen una clave par la regulación de los periodos críticos.
- IX) Reactivación en la adultez que confirma la existencia de periodos críticos. Dependiendo si el crecimiento neuronal está rígidamente limitado a un período crítico, diferentes estrategias terapéuticas,

recuperación de una injuria, y educación continua podrán ser aplicadas a distintas áreas del cerebro.

(Hensch 2004, Hensch y Fagiolini 2005)

1.2.4. Determinantes de períodos críticos

Recientemente se han establecido algunos factores cuyo estado es determinante de períodos críticos: **receptores de glutamato (tipo NMDA), neurotrofinas y circuitos inhibitorios.**

La participación de los receptores NMDA en la plasticidad del desarrollo tiene lugar en la corteza somatosensorial, la corteza auditiva y el sistema visual, en éste último el bloqueo de los receptores bloquea el efecto de la dominancia ocular, (Bear y col. 1990, Schlaggar y col. 1993, Feldman col. 1996). Existen dos propiedades de los receptores NMDA que los convierten en determinantes moleculares de períodos críticos, la primera es que la transmisión sináptica (en corteza visual) que ellos median es regulada durante el desarrollo y la segunda es que su expresión es modificada por actividad eléctrica (Catalano y col. 1997, Livingston y Mooney 1997). Este apartado será tratado más adelante en mayor profundidad.

En cuanto a las neurotrofinas, varias observaciones sugieren que éstas ejercen importantes roles en el control del desarrollo de plasticidad; la aplicación exógena de neurotrofinas contrarresta los efectos de la privación monocular y previene la formación de las columnas de dominancia ocular. Las neurotrofinas pueden modular la transmisión sináptica y al igual que los receptores NMDA, su expresión está regulada durante el desarrollo y es dependiente de la actividad eléctrica (Berardi y Maffei 1999, McAllister y Katz 1999). Además, las neurotrofinas controlan la duración de períodos críticos, éstas son las primeras moléculas para las cuales se ha establecido una relación causal entre su acción y la duración del período crítico en mamíferos. Una de las primeras evidencias demuestra que el bloqueo del factor de crecimiento nervioso (NGF) a través del uso de anticuerpos prolonga la duración del período crítico visual en roedores (Domenici y col. 1994). En otros experimentos realizados en rata se ha demostrado que la infusión intra-estriatal de NGF durante un período crítico de

actividad motora, suprime los efectos del entrenamiento motor (Wolansky y col. 1999).

Con respecto a los circuitos inhibitorios, la plasticidad dependiente de actividad no está limitada a circuitos excitatorios. En distintos experimentos se demuestra el rol de circuitos intracorticales inhibitorios en plasticidad visual durante el período crítico. Uno de ellos muestra que las interacciones inhibitorias son necesarias para la manifestación de la plasticidad dependiente de actividad en ratones transgénicos que carecen de una isoforma de la enzima sintetizadora de GABA (ácido γ -amino butírico). La plasticidad normal en dichos animales puede ser recuperada si la transmisión GABAérgica es aumentada en la corteza visual por medio de benzodiazepinas (Hensch y col. 1998, Hensch y Fagiolini 2005).

Específicamente, el neurotransmisor inhibitorio primario en el cerebro, GABA, es sintetizado por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) producida por dos genes, *Gad65* y *Gad67*. De ambas isoformas, GAD65 está concentrada en terminales axónicos y unida a vesículas sinápticas mientras que GAD67 se encuentra en toda la neurona (Soghomonian y Martin 1998).

La deleción, en ratones, de *Gad67* es letal y elimina la mayor parte del GABA cortical, pero los ratones con deleción de *Gad65* son viables y muestran escasa liberación de GABA sólo con fuerte estimulación (Asada y col. 1997, Hensch y col. 1998, Tian y col. 1999). De esta manera, la ausencia de GAD65 anula la plasticidad de dominancia ocular hasta que la inhibición es restaurada mediante el uso de diazepam (Hensch y col. 1998).

Cabe destacar, que el rescate de plasticidad es posible en cualquier edad en los ratones carentes de *Gad65*, lo cual indica que el período crítico es dependiente de los correctos niveles de transmisión inhibitoria (Fagiolini y Hensch 2000).

Contrariamente, el inicio del período crítico visual puede ser acelerado por un aumento prematuro de inhibición con benzodiazepinas, como con una sobre expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF que promueve la maduración de las neuronas GABAérgicas (Hanover y col. 1999, Fagiolini y col. 2004).

1.2.5. La matriz extracelular y la plasticidad visual

Como se conoce, una substancial cantidad del volumen cerebral consiste de espacio extracelular interpuesto entre las células cerebrales. Este espacio es llenado con una matriz de moléculas que están unidas entre sí y con moléculas unidas a membrana. Estas interacciones son determinantes de las propiedades mecánicas del tejido nervioso y son capaces de activar cascadas de señalización intracelular. Recientemente, un gran número de estudios han involucrado elementos de esta red, como integrinas, cadherinas, NCAM y proteoglicanos en la plasticidad sináptica y en procesos de aprendizaje y memoria (Dityatev y Schachner 2003). También se ha demostrado un importante rol para un componente de la matriz extracelular (MEC), el proteoglicano condroitín-sulfato (CSPGs) en la plasticidad de dominancia ocular de la corteza visual.

Los CSPGs son los mayores componentes de la MEC, son inhibitorios para la ramificación axonal y luego de una injuria aumenta su expresión en el SNC con el efecto de bloquear la regeneración axonal (Bradbury y col. 2002, Silver y Miller 2004). Durante el desarrollo, los CSPGs se condensan a altas concentraciones en estructuras entrelazadas llamadas redes perineurales, las cuales envainan las neuronas visuales corticales. El proceso de condensación comienza durante el desarrollo tardío y es completado después de la finalización del período crítico. La oscuridad, que prolonga la finalización del período crítico, también prolonga la condensación de los CSPGs (Hockfield y col. 1990). La degradación en la corteza visual de estos CSPGs con la enzima condroitinasa ABC, reactiva la plasticidad de DO en ratas adultas monocularmente deprivadas de visión, sugiriendo que la MEC de adulto enriquecida en CSPGs ejerce un poderoso rol inhibitorio en el control de la plasticidad de DO.(Pizzorusso y col. 2002).

La influencia del ambiente extracelular en la plasticidad de DO no está limitada a la corteza de adulto y ocurre también durante el período crítico. La inhibición farmacológica de la actividad de la proteasa extracelular tPA traba la plasticidad cortical visual (Mataga y col. 1996, Muller y Griesinger 1998) y la deprivación monocular no es efectiva en ratones con una delección del gen de dicha proteasa (Mataga y col. 2002). La plasticidad puede ser recuperada en

ratones con el gen de la proteasa anulado, mediante la administración exógena de la proteasa durante el período de privación monocular. Este hecho es apoyado por la observación de que en animales normales la privación monocular permite un rápido y transiente incremento de la actividad de la proteasa durante el período crítico pero no en el adulto (Mataga y col. 2002).

1.3. ACTIVIDAD MOTORA Y SU IMPLICANCIA EN LA PLASTICIDAD

1.3.1. Sistemas motores

Un desarrollo apropiado del período crítico es prerrequisito para el correcto control motor y el movimiento coordinado en la vida adulta. La competencia entre múltiples axones motores por una única fibra muscular elimina sinapsis en las uniones neuromusculares durante el desarrollo postnatal (Sanes y Lichtman 1999)

La accesibilidad de esta clásica preparación la convierte en el prototipo de modelo sináptico de plasticidad del período crítico en el sistema nervioso. La visualización directa de la interacción y remoción de una masiva cantidad de axones motores durante las 2 primeras semanas postnatales en roedores delinea una progresión de eventos sinápticos desde el refuerzo de la eficacia funcional hasta la consolidación eventual de su estructura (Lichtman y Colman 2000, Walsh y Lichtman 2003) El período de refinamiento es disminuido o acelerado por el bloqueo o aumento crónico de la actividad neuromuscular, respectivamente (Thompson 1985).

En contraste, las uniones neuromusculares inicialmente se forman en ausencia total de neurotransmisión, como se ha visto en ratones que carecen de la enzima sintetizadora de acetilcolina, colin acetyl-transferasa (ChAT) (Brandon y col. 2003). La delección condicional del gen de ChAT en un pequeño subset de axones demuestra que mejora la excitación de las fibras musculares y predispone la competencia a favor de los inputs intactos (Buffelli y col. 2003)

La competencia ocurre globalmente más que localmente, dirigida por la actividad presináptica que es directamente adjudicada por la fibra muscular postsináptica. En el SNC es difícil aislar inputs de células individuales. Los axones de las fibras ascendentes del núcleo de la oliva inferior del tallo encefálico que inervan los somas de las células de Purkinje cerebelares son un raro ejemplo. Múltiples fibras ascendentes presentes al nacimiento son podadas dando lugar a una relación uno a uno más potente en las primeras semanas de vida (Crepel 1982). Al igual que para las uniones neuromusculares (Lichtman y Colman 2000) una disparidad de potencia en la excitación sináptica precede a la eliminación eventual (Hashimoto y Kano 2003), determinando en la célula postsináptica qué input retiene.

Por otra parte, en el modelo mencionado de las fibras ascendentes del cerebelo, el bloqueo de los receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) define un remarcable período crítico agudo de 2 días (PN15-16 en ratón) para el refinamiento de las fibras ascendentes (Kakizawa y col 2001). Esto es curioso ya que las células de Purkinje están desprovistas de receptores NMDA funcionales (Farrant y Cull-Candy 1991).

Finalmente, a nivel neocortical, en el sistema motor, el refinamiento es influenciado por una apropiada conexión sensorial durante el desarrollo temprano. El recorte de los bigotes del hocico de una rata desde el nacimiento (pero no en un adulto) produce una significativamente menor área motora contralateral que evoca patrones anormales de movimiento (Huntley 1997) La base para estos efectos cross-modales probablemente sea muy compleja.

1.3.2. Actividad motora

Un eje principal de las investigaciones en neurobiología corresponde al estudio del comportamiento motor. Y un objetivo fundamental es la comprensión de las distintas fisiopatologías motoras. El primer paso exitoso en pos de dicho objetivo, fue la explicación neuroquímica de las distintas disquinecias (enfermedad de Parkinson, corea de Huntington). Si bien aún no es completa y

puede ser profundizada, permitió relacionar por primera vez una estructura nerviosa particular, en este caso los ganglios basales, con una patología determinada del SNC (Penney y Young 1983).

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 (Clarkson-Smith y Hartley 1989, Emmerson y col. 1989, Dustman y col. 1990, Gleser y Mendelberg 1990, Fordyce y Farrar 1991, Lupinacci y col. 1993). También que el entrenamiento físico mejora las condiciones psíquicas (Blomquist y Danner 1987, Rogers y col. 1990). 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 (MacRae y col. 1987, Gleser y Mendelberg 1990) y también modificar los niveles del receptor colinérgico muscarínico en hipocampo (Fordyce y col. 1991) y del dopaminérgico en cuerpo estriado (Gilliam y col. 1984).

No obstante estos resultados, los procesos plásticos desencadenados por la actividad motora aún están muy lejos de ser dilucidados por completo. 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, y de las alteraciones 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.

1.3.3. Inducción de mecanismos plásticos por la actividad motora

Además de los cambios ya mencionados en los sistemas de neurotransmisión se ha demostrado la inducción en el hipocampo de rata de las neurotrofinas NGF y BDNF (Neeper y col. 1995, 1996) y de la neurogénesis y los niveles de la neurotrofina bFGF en ratón (van Praag y col. 1999) como consecuencia de la actividad motora. Estas neurotrofinas están asociadas con mecanismos plásticos (Berardi y col. 1999, 2000), reciclaje de neurotransmisores (Sauer y col. 1993) y crecimiento neuronal (Diamond y col. 1992) y se ha descrito la regulación de su expresión por la actividad neuronal (Zafra y col. 1991, Gwag y Springer 1993). De esta manera, la actividad motora parece ser capaz de desencadenar los distintos mecanismos de plasticidad a partir de la activación neuronal de las vías nerviosas involucradas.

1.3.4. Pruebas para el análisis comportamental

En los estudios de plasticidad sensorial, los cambios morfológicos y neuroquímicos son evaluados a partir de la modificación de un estímulo sensorial particular (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 (Geyer 1990). Dichas pruebas han sido categorizadas de acuerdo a las funciones cerebrales que están involucradas mayoritariamente en cada tarea particular (aprendizaje asociativo y de habilidades motoras, funciones sensoriales, nivel de actividad, respuestas farmacológicas). Las pruebas motoras pueden clasificarse en pruebas apicales y no apicales (Vorhees 1987).

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.

1.3.5. Comportamiento motor

Las pruebas utilizadas para el estudio del comportamiento motor deben presentar ciertas características (Vorhees 1987, Geyer 1990, Brusés y Azcurra 1993). La prueba ideal debería considerar: a) la medición cuantitativa del cumplimiento de la prueba, b) la presencia de distintos procesos neuronales superiores (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 analizar 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.

1.3.6. Entrenamiento rotatorio e inducción de cambios plásticos

El comportamiento rotatorio en animales, el giro sobre sí mismos, ha despertado gran interés y ha sido extensamente estudiado en ratas y ratones. La actividad rotatoria que es parte del comportamiento motor normal (Arbuthnott y Crow 1971, Glick y col. 1976, Glick y Cox 1978), puede ser inducida por la administración de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) que destruye en forma específica las proyecciones dopaminérgicas de la sustancia nigra al cuerpo estriado (Von Voigtlander y Moore 1973, Ungerstedt y Arbuthnott 1970, Hefti y col. 1980). 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 (Christie y Crow 1971, Von Voigtlander y Moore 1973, Glick y col. 1976). 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 desconexión. Estas alteraciones involucran cambios en la densidad y en los niveles de expresión de los neuroreceptores dopaminérgicos (Qin y col. 1994). Estos resultados permitieron utilizar al comportamiento rotatorio como un modelo para el estudio neuroquímico de la actividad motora (Robinson y Becker 1983). 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 (Penney y Young 1983).

Análogamente, el empleo de una prueba donde los animales realizan una actividad circular en un disco, permitió obtener resultados y conclusiones similares (Yamamoto y Freed 1982). 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 (Yamamoto y Freed 1982, Young y col. 1991), activación de la tirosina-hidroxilasa (Morgan y col. 1984) y el disparo de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Diana y col. 1989).

Por 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 (TEC) en nuestro laboratorio demostró, mediante el uso de drogas de reconocido efecto sobre el SNC, ser una prueba motora que sirve específicamente para la evaluación de plasticidad en las estructuras nerviosas involucradas en el comportamiento motor (Brusés y col. 1991, Brusés y Azcurra 1993).

1.3.7. 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 un sentido de giro predeterminado (giro hacia la derecha o hacia la izquierda), en busca de una recompensa hídrica. Este modelo fue inicialmente desarrollado para el estudio del metabolismo dopaminérgico involucrado en la actividad motora (Yamamoto y Freed 1982) 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 en los apartados anteriores. 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.

1.4. EL CUERPO ESTRIADO EN EL ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD

1.4.1. El cuerpo estriado como área de estudio

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 experimental, 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 fueron mencionados 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 estructura particular le permiten 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 (Cools y col. 1981, Marsden 1981, Oberg y Divac 1981).

Actualmente, existe una convincente evidencia que las funciones relacionadas al aprendizaje son esenciales para el rol que cumplen los ganglios basales en seleccionar cuáles acciones realizar según el contexto. Numerosos estudios se están focalizando en cómo esas funciones de aprendizaje son implementadas dentro del entramado de circuitos internos de los ganglios basales para promover un óptimo control de la acción (Graybiel 2005).

El estudio del cuerpo estriado se ha convertido así, en uno de los temas de investigación más importantes y más citados en neurobiología 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.

1.4.2. 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 (disquinecias) se debía a la lesión de la mencionada área cerebral en la enfermedad que lleva su nombre, también denominada degeneración hepatolenticular. Otras patologías motoras (enfermedad de Parkinson, corea de Huntington) incluyen serios trastornos del cuerpo estriado (Penney y Young 1983, Albin y col. 1989, Carlsson y Carlsson 1990, Wichmann y DeLong 1993). 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, está relacionada con la degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal. Los movimientos coréicos 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.

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 (Penney y Young 1983). En todos los casos está demostrada la alteración celular y neuroquímica del cuerpo estriado como causa principal.

Desde el campo farmacológico, también se aportaron muchas pruebas de la vinculación del cuerpo estriado con el control de la actividad motora. Por un lado, se observó la inducción de disquinecias durante el tratamiento clínico con fármacos que actuaban sobre el cuerpo estriado o la vía nigroestriatal como la levodopa (Barbeau y col. 1971) y los antipsicóticos (Baldessarini y Tarsy 1980). Evidencias similares fueron obtenidas luego de la lesión experimental del cuerpo estriado con ácido caínico (Divac y col. 1978) o con ácido quinolínico (Nicholson y col. 1995). Complementariamente, otros investigadores evaluaron el efecto de la lesión unilateral de la vía nigroestriatal sobre el comportamiento motor. La destrucción electrolítica (Schwartz y col. 1976) o farmacológica (Glick y col. 1976) 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 neurofarmacológica de estimulantes Psicomotores como la cocaína y la amfetamina (Graybiel y col. 1990, Koob y col. 1992, Nestler 1993).

Finalmente, el registro electrofisiológico de las neuronas estriatales durante el comportamiento motor sustenta la idea de su participación en los procesos relacionados con dicha actividad (Marsden 1980, Graybiel 1994). 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 (Morgan y col. 1984).

1.4.3. 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 cuya funcionalidad es mucho más compleja que lo sospechado inicialmente. El descubrimiento de patrones de disparo neuronal relacionado 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 (Hikosaka y Wurtz 1986). Diversas investigaciones, la mayoría de ellas en seres humanos muestran la importancia del sistema corticoestriatal en el aprendizaje motor y la memoria implícita involucrada en la adquisición de habilidades cognitivas, preceptuales y motoras (Saint-Cyr y col. 1990, Salmon y Butters 1995), así como en el desarrollo de hábitos de estímulo respuesta (Mishkin y col 1984).

Los estudios en 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 (Butters y col.) y visuoperceptuales (Paulsen y col. 1993). Trastornos similares fueron observados en pacientes recuperados de una hemiparesis por infarto primario de los ganglios basales (Platz y col. 1994) 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 (Granholm y col. 1993).

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 (Dunbar y col. 1993). Los animales también muestran falencias para aprender a girar en una determinada dirección a fin de obtener un refuerzo alimenticio (Kesner y col. 1993). 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 (McDonald y White 1994).

De todas maneras, el daño del cuerpo estriado no afecta otros tipos de aprendizaje, como el aprendizaje asociativo relacionado con el hipocampo (McDonald y White 1993). 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, la memoria procedural y en el aprendizaje de habituación no motor que requiere una capacidad asociativa de incrementación gradual (McDonald y White 1993, Knowlton y col. 1996).

Una idea clave que está emergiendo en el campo de investigación de los ganglios basales es que los circuitos corteza-ganglios basales promueven el aprendizaje de secuencias de acciones a través del aprendizaje de prueba y error. Tres nuevos trabajos proveen evidencias para ese concepto de la función de los ganglios basales en el canto de pájaros (Kao y col. 2005, Olveczky y col. 2005) y mamíferos (Barnes y col. 2005). Durante ese aprendizaje de prueba y error el animal primero explora el ambiente: el comportamiento es variable, y las recompensas moldean el comportamiento hasta que éste converge en el óptimo para ese contexto. Entonces, la explotación, con repetición de comportamiento exitoso, reemplaza la exploración (Ishii y col. 2002). En este último trabajo se apoya la idea que los ganglios basales, guiados por un mecanismo sensible a recompensa de las neuronas que contienen dopamina de la sustancia nigra, pueden aprender e instaurar la política de comportamiento,

con un feedback que lleva al ajuste del comportamiento por medio de un mecanismo similar.

De esta manera, los ganglios basales son parte de un gran set de sistemas neuronales adaptativos que promueven el óptimo control motor y cognitivo.

1.4.4. 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 (Robbins y Everitt 1996). 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 de tipo NMDA) y dopaminérgico en el cuerpo estriado y su conexión con los núcleos amigdalinos (Robbins y col. 1989). Otros investigadores confirmaron la importancia del cuerpo estriado en estos procesos, al estudiar ratones transgénicos con déficit en el funcionamiento de esta estructura (Xu y col. 1994). 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 (Wise 1981, Schultz y col. 1993, Aosaki y col. 1994).

1.4.5. 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. Por su participación en los distintos desórdenes neurodegenerativos, que involucran degeneraciones cognitivas y motoras, es un blanco farmacológico por excelencia. Así, el cuerpo estriado se ve afectado por distintas drogas de abuso, como la cocaína, la

morfina y la anfetamina (Graybiel y col. 1990, Young y col. 1991, Moratalla y col. 1993, Liu y col. 1994). 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 (Nestler 1992, Konradi y col. 1994). La cocaína, por ejemplo, afecta la liberación y recaptación de los neurotransmisores catecolaminérgicos (Koob 1992). Más importante aún es el efecto sobre los proto-oncogenes c-fos y 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 proto-oncogenes (Graybiel y col. 1990, Young y col. 1991, Moratalla y col. 1993, Liu y col. 1994), los que a su vez están involucrados con una amplia variedad de respuestas plásticas en el cuerpo estriado (Rauscher y col. 1988, Sagar y col. 1988). Todos estos experimentos en conjunto presentan al cuerpo estriado como un 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 de uso clínico habitual están fuertemente relacionados con los mecanismos plásticos estriatales. El efecto de estas drogas sobre los mecanismos plásticos del cuerpo estriado es importante 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. De hecho, 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 (Klinzova y col. 1990, Kerns y col. 1992, Wolansky y col. 2004).

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.

1.5. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DEL CUERPO ESTRIADO

1.5.1. Anatomía funcional y organización estructural

El cuerpo estriado de mamíferos, conformado por el **núcleo caudado y el putamen**, es la estructura más importante de los ganglios basales y ejerce un rol fundamental en procesos motores (regulación extrapiramidal) y de aprendizaje (aprendizaje procedural, adquisición de habilidades cognitivas, perceptuales y motoras), por medio de una compleja organización funcional (Gerfen 1992 (a, b), Parent y Hazrati 1995). En conjunto con el globo pálido (paleoestriado), la amígdala o núcleos amigdalinos (arquistriado) y el núcleo subtalámico, conforma los ganglios basales.

A nivel morfológico, el cuerpo estriado es una estructura alargada con cabeza piriforme que se continúa por un extremo delgado prolongado caudoventralmente (Figura 1).

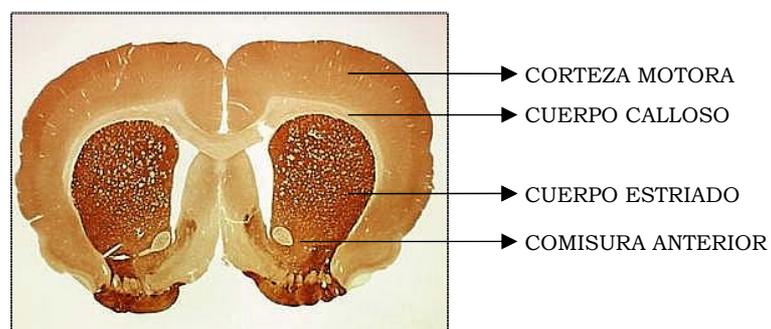


Figura 1: Corte transversal de cerebro de rata.

Esta imagen corresponde a un corte visualizado mediante técnicas inmunohistoquímicas donde claramente se pueden apreciar el cuerpo estriado, corteza motora, cuerpo calloso y la comisura anterior.

Como se puede observar en la Figura 2, el cuerpo estriado recibe sus aferencias principalmente de la corteza cerebral, del tálamo y de la sustancia nigra pars compacta; y provee proyecciones hacia la sustancia nigra y al globo pálido

(Parent 1990, Gerfen 1992(a)). Las **proyecciones corticoestriatales** y **tálamoestriatales** son fibras glutamatérgicas excitatorias y utilizan el glutamato como neurotransmisor a través de los receptores NMDA/AMPA. La sustancia nigra envía **proyecciones dopaminérgicas** inhibitorias al tálamo actuando sobre los receptores dopaminérgicos subtipo D1 y D2. De esta manera la sustancia nigra ejerce una acción moduladora sobre las señales excitatorias de la corteza y del tálamo (Arbuthnott y col. 1998).

Del cuerpo estriado salen dos vías eferentes gabaérgicas inhibitorias que determinan la **vía directa** e **indirecta**. Las fibras estriatonigras que conectan directamente con la sustancia nigra pars reticulata y las fibras estriatopalidales que conectan con el globo pálido conforman la vía directa. Las neuronas que constituyen la vía indirecta proyectan al globo pálido externo, el cual proyecta a su vez al núcleo subtalámico y éste último produce una conexión con la sustancia nigra pars reticulata (Alexander y Crutcher 1990, Chesselet y Delfis 1996). 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 (Gerfen 1992 (a, b), Parent y Hazrati 1995). 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 aferencias nigrotalámicas que, conectadas con el núcleo intralaminar, realizan retroalimentación sobre el cuerpo estriado (Gerfen 1992), o las interconexiones entre los cuerpos estriado derecho e izquierdo (Parent y Hazrati 1995).

Las consecuencias de la activación de las vías directa e indirecta son funcionalmente opuestas en las regiones blanco de los ganglios basales (Alexander y Crutcher 1990, DeLong 1990). Así, la activación de la vía directa lleva a una desinhibición de las neuronas que reciben la conexión, mientras que la activación de la vía indirecta lleva a una inhibición de las neuronas blanco.

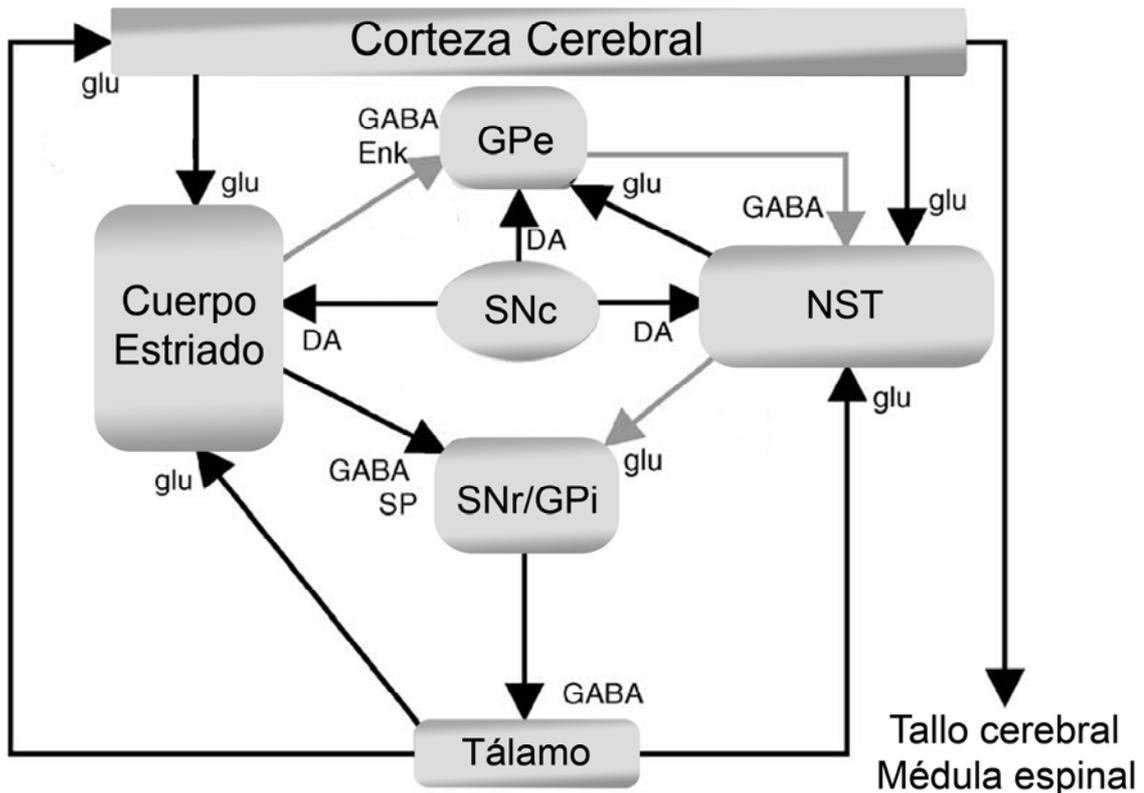


Figura 2. Esquema de las conexiones de los ganglios basales. Como se puede observar en esta figura, el cuerpo estriado recibe aferencias excitatorias desde el tálamo y la corteza mediante el neurotransmisor glutamato (glu), también desde la sustancia nigra pars compacta (SNc) mediante la dopamina (DA) actuando sobre los receptores subtipo D_1 . A su vez, la dopamina proveniente de la sustancia nigra ejerce una acción inhibitoria sobre el tálamo bloqueando la liberación de glu. El cuerpo estriado envía proyecciones inhibitorias hacia el globo pálido (GPe/GPi: globo pálido externo e interno) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) mediante el neurotransmisor ácido γ -amino butírico (GABA). Las flechas en color gris representan las conexiones de la vía indirecta. NST: núcleo subtalámico.

Al progresar en el conocimiento del cuerpo estriado se evidencia 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 (Kemp y Powell 1970). La información cortical, junto con información de neuronas locales y otros aferentes extrínsecos, es integrada dentro del estriado primariamente por las neuronas proyectivas espinosas. Un ejemplo de ello es 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 (Parent 1990). Esta

parcelación indica una organización espacial del procesamiento de la información que recibe el cuerpo estriado.

Otra característica importante de la organización del sistema corticoestriatal está determinada por la particular heterogeneidad del cuerpo estriado que muestra, a nivel histológico, una estructura interna subdividida en dos áreas distintas: la **matriz** y los **estriosomas** (o parches). Si bien no representan compartimentos independientes, ambas estructuras se diferencian entre sí por la desigual distribución de distintos neuropéptidos y enzimas vinculadas con la metabolización de distintos neurotransmisores (Graybiel y Ragsdale 1978, Gerfen 1992 (b)). A esta distribución en matriz y parches se le denominó mosaico, y es de importancia funcional ya que las distintas aferencias y conexiones internas mantienen una distribución particular en referencia a estas estructuras (Gerfen 1985, 1989, 1992 (a, b) Parent y Hazrati 1995).

1.5.2. Composición celular

Es necesario el conocimiento de la organización intrínseca del cuerpo estriado para entender la neurobiología de los procesos en que este núcleo interviene. 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, 9:1 en ratas y 3:1 en primates (Graveland y DiFiglia 1985).

Las neuronas proyectivas integran más del 95% de las neuronas del estriado, son las que reciben la mayoría de los inputs sinápticos aferentes y son los principales outputs de esta estructura (Graybiel 1990, Gerfen y Wilson 1996, Rymar y col. 2004). Una vez procesada, la información cortical es transmitida al núcleo de salida de los ganglios basales por una subpoblación de neuronas espinosas que proyectan directamente a dicho núcleo, o a una subpoblación separada de neuronas espinosas que conducen la información procesada al núcleo de salida por un camino indirecto (vía indirecta). Este tipo de neuronas poseen un diámetro de 12-20 μm , irradian 4 a 5 dendritas primarias que se

adelgazan y presentan una gran cantidad de especializaciones de la membrana conocidas como espinas dendríticas; se las denomina **neuronas espinosas medianas** (Wilson y Groves 1980). 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 (Kawaguchi y col. 1990). El patrón más común consiste en la arborización axonal restringida al dominio dendrítico propio de la célula de origen, o a 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 (Park y col. 1980, Tepper y col. 2004, Wilson 2007).

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 comúnmente no interacciona con la célula originaria (Kawaguchi y col. 1990).

Todas las neuronas espinosas medianas son gabaérgicas, utilizan al ácido γ -amino butírico (GABA) como principal neurotransmisor y co-expresan los neuropéptidos sustancia P, encefalina y dinorfina, por lo cual realizan una función inhibitoria sobre sus blancos postsinápticos (Hokfelt y col. 1977, Ribak y col. 1979, Aronin y col. 1984, Oertel y Mugnaini 1984, Gerfen (a) 1992, Graybiel 1992). La expresión simultánea de algunos de estos péptidos permite definir subgrupos particulares de neuronas.

La subpoblación de neuronas espinosas que participan de la vía directa e indirecta fue posteriormente caracterizada por su expresión selectiva de neuropéptidos y subtipo de receptor de dopamina. Así, aunque las neuronas espinosas estriatales utilicen GABA como principal neurotransmisor, la subpoblación que participa en la vía directa contiene sustancia P y dinorfina y preferencialmente expresan el subtipo D1 de receptor de dopamina, y la subpoblación que participa de la vía indirecta contiene encefalina y preferencialmente expresan el subtipo D2 de receptor de dopamina (Gerfen y Young 1988, Albin y col. 1989, Gerfen y col. 1990, Le Moine y col. 1990, 1991,

Gerfen (a) 1992, Gerfen y Wilson 1996). Sólo una pequeña subpoblación de neuronas estriatales expresan ambos subtipos de receptor (Surmeier y col. 1994, 1996).

Un segundo tipo neuronal son las interneuronas, estas células presentan características morfológicas, fisiológicas y químicas diferentes de las neuronas proyectivas (Kawaguchi y col. 1995). 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 sus dendritas. Las interneuronas pueden agruparse en dos amplias categorías morfológicas: I) interneuronas no espinosas gigantes y II) interneuronas no espinosas medianas (DiFiglia y col. 1976, Kawaguchi y col. 1995). Al primer grupo pertenecen las interneuronas colinérgicas, producen el neurotransmisor acetilcolina (ACh), y las restantes interneuronas son gabaérgicas. La transmisión sináptica estriatal es modulada por ACh, dicho neurotransmisor media mecanismos de crucial importancia en el procesamiento de señales desde la corteza hacia el estriado, ya que regula la actividad neuronal como así también la liberación de neurotransmisores (Calabresi y col. 2000).

Las **interneuronas no espinosas gigantes colinérgicas** tienen cuerpos celulares de 20-60 μm de diámetro con pocas dendritas, las cuales 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 presentan menos del 3% de las neuronas estriatales y pueden ser reconocidas específicamente por la detección de la enzima ChAT (Hoover y col. 1978, Phelps y col. 1985).

Las **interneuronas no espinosas medianas gabaérgicas** pueden ser divididas en tres categorías según diferentes métodos inmunohistoquímicos (DiFiglia y col. 1976, Kawaguchi y col. 1995). El primer grupo contiene parvalbúmina y la enzima GABA descarboxilasa (GAD), representa del 3-5% de la población neuronal del cuerpo estriado y tienen un tamaño de 10-25 μm de diámetro de

cuerpo neuronal. Presentan de 5-8 dendritas y el axón es corto y profusamente arborizado. Un segundo grupo contiene somatostatina y neuropéptido Y. No contienen GAD pero sí la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-D), que está involucrada en la producción de óxido nítrico, postulado como mensajero retrógrado (Bredt y col. 1990, Vincent y Kimura 1992). La interneurona somatostatinérgica, representa del 1-2% de la población neuronal, tiene un diámetro de 12-35 μm , posee un axón corto y muy arborizado y 3-4 dendritas largas (150 μm) prácticamente rectas, que exhiben apéndices tipo espinas. Finalmente, el tercer grupo de interneuronas gabaérgicas presenta inmunoreactividad para calretinina y GAD y tienen entre 7 y 20 μm de diámetro.

1.5.3. Conexiones extrínsecas e intrínsecas sobre la neurona estriatal gabaérgica proyectiva

Los distintos tipos neuronales descritos anteriormente participan en circuitos básicos donde el elemento central es la neurona espinosa mediana. Estas neuronas gabaérgicas representan el origen de las principales eferencias del cuerpo estriado, que se conectan con el globo pálido y la sustancia nigra (Gerfen (a, b) 1992, Parent y Hazrati 1995), dando también conexiones intrínsecas.

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, 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 (Parent y Hazrati 1995).

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, mientras que las conexiones tálamoestriatales realizan también sinapsis asimétricas pero 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 (Bouyer y col. 1984).

Las interneuronas estriatales, que comparativamente, reciben pocas aferencias extrínsecas glutamatérgicas, 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 con todas las regiones de la neurona espinosa mediana proyectiva; con los brazos dendríticos, las espinas dendríticas y el pericarion neuronal en una relación 5:3:2 respectivamente (Hokfelt y col. 1977). 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.

1.5.4. El sistema colinérgico-dopaminérgico

Como se describió previamente, 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

(Lehmann y Langer 1983). 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 está asociado a distintas hiperquinesias, como la corea de Huntington. Esto se debe a que la dopamina inhibe tónicamente la liberación de acetilcolina y esta inhibición afecta un blanco postsináptico común, la neurona proyectiva mediana. El concepto de 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 (Freund y col. 1984), 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 (Lehmann y Langer 1983), queda claro que la interacción colinérgica-dopaminérgica modula directamente a las neuronas proyectivas medianas.

1.5.5. Aspectos neuroquímicos

La acción directa de los neurotransmisores sobre sus receptores así como la modulación de éstos es el primer paso en la respuesta neuronal a nivel de membrana, seguido por los mecanismos de transducción de señal y el disparo de la expresión de los genes de transcripción inmediata. La función de los neuroreceptores es crítica y muy compleja como la interrelación en que participan los principales receptores estriatales distribuidos en distintas subpoblaciones neuronales.

Estos receptores estriatales son: el receptor de acetilcolina tipo muscarínico (mAChR), el receptor de dopamina y el receptor de glutamato de tipo NMDA (Di Chiara y col. 1994). La estimulación de los receptores dopaminérgicos subtipo D1 en neuronas en reposo recompone los niveles de magnesio por inactivación de corrientes lentas de potasio, eliminando así el bloqueo de los receptores NMDA y posicionando 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 estabilizar a las neuronas. Por otra parte, la acción de

la acetilcolina mediante los receptores muscarínicos, influye sobre las corrientes de potasio que están activadas o inactivadas dependiendo del estado celular, en reposo o en actividad, respectivamente (Kitai y Surmeier 1993).

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 (Di Chiara y col. 1994, Pisani y col. 2001 (b)).

La función del receptor dopaminérgico subtipo D2, el cual presenta una ubicación preferencialmente presináptica, es inhibir la liberación de dopamina sobre el cuerpo estriado, actuando como autoreceptor. También modula, como heteroreceptor, la liberación de acetilcolina y glutamato (Drukarch y col. 1990).

1.5.6. Desarrollo del cuerpo estriado

El desarrollo del cuerpo estriado consta de distintas fases las cuales comienzan en el desarrollo embrionario y continúan durante la etapa postnatal temprana, éstos últimos son los procesos relacionados con el ajuste final del sistema.

En el ratón, la emergencia del estriado sucede durante la segunda mitad de la gestación, el pico de producción de células se produce entre los días 14 y 18 de la gestación (G 14 – G 18) (Rodier 1988). La división de las interneuronas estriatales tiene su pico hacia el día G 21 y se extiende hasta varios días después del nacimiento (Das y Altman 1970)

La sustancia nigra envía sus axones al estriado en el comienzo de la tercer semana de gestación, alcanzándolo entre G 20 y G 21, es decir casi el momento del nacimiento, siendo funcionales estas conexiones durante el desarrollo postnatal (Lauder y Bloom 1974, 1975).

Mientras que al nacimiento el desarrollo del sistema dopaminérgico es un 10% de los valores en el adulto, la funcionalidad de las interneuronas colinérgicas es

de un 2% (Coyle y Campochiaro 1976). Los niveles maduros del receptor colinérgico muscarínico se alcanzan alrededor de los días PN 18 y PN 20 (Coyle y Yamamura 1976, Aubert y col. 1996). Ciertos estudios han demostrado que las neuronas colinérgicas, si bien probablemente son las primeras neuronas que aparecen en el cuerpo estriado, presentan un dramático aumento y complejización de su arborización dendrítica alrededor del día PN 14 (Phelps y col. 1989).

El acoplamiento funcional entre los terminales dopaminérgicos provenientes de la nigra y las interneuronas colinérgicas del estriado sucede hacia comienzos de la segunda semana de vida postnatal (PN 8) (Coyle y Campochiaro 1976). La actividad de estos sistemas va aumentando durante la vida postnatal, alcanzando un 70-75 % de los valores adultos finalizando la cuarta semana de vida (~PN 28). Otros trabajos informan que los niveles de receptores dopaminérgicos en este núcleo van en incremento desde el nacimiento hasta alcanzar un pico en el día PN 28 y es seguido luego por un ajuste de eliminación o “podado” hasta alcanzar los niveles adultos (Tarazi y col. 1998).

Con respecto a la maduración de los receptores glutamatérgicos, los niveles de receptores de tipo NMDA alcanzan su pico de maduración con una mayor respuesta funcional alrededor del día PN 14 y luego se produce un leve declinamiento a los PNs 21 y 28 hasta alcanzar los valores adultos (PN 60) (Colwell y col. 1998). Posteriormente, otros autores indicaron una mayor inmunoreactividad al PN 14 (Lau y col. 2003).

Finalmente, la maduración funcional de los sistemas de neurotransmisión no sólo debe ser evaluada en términos 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.

1.6. RECEPTOR DE GLUTAMATO TIPO NMDA Y PLASTICIDAD SINÁPTICA ESTRIATAL

1.6.1. Plasticidad sináptica corticoestriatal

Potenciación de largo plazo (LTP) y depresión de corto plazo (LTD) son los modelos más comúnmente usados para los mecanismos celulares que comprenden la formación de la memoria. Estas formas de plasticidad sináptica han sido descritas en las sinapsis corticoestriatales de las neuronas espinosas medianas tanto *in vitro* (Calabresi y col. 1992 (a, b)) como *in vivo* (Charpier y Deniau 1997). Este descubrimiento ha sido recibido con gran interés ya que LTP y LTD han sido observados y estudiados en diversas áreas cerebrales como, corteza, hipocampo y cerebelo, donde son considerados la base celular de procesos de memoria, aprendizaje y control motor (Bliss y Lomo 1973, Bear y Malenka 1994).

En el estriado, la inducción de LTD y LTP es obtenida mediante estimulación de alta frecuencia de las fibras corticoestriatales. La inducción de LTP requiere la activación de los receptores NMDA, esta forma de plasticidad sináptica es bloqueada por AP-5, un antagonista de dicho receptor (Calabresi y col. 1992 (b)).

Además, se ha descrito una forma de LTD y LTP que involucra cambios presinápticos (García-Muñoz y col. 1996), este tipo de plasticidad sináptica es presumiblemente debido a la acción del glutamato mediante autoreceptores presinápticos que conllevan a la activación de segundos mensajeros mediante el Ca^{++} .

Una compleja forma de LTP también ha sido observada en las interneuronas colinérgicas luego de estimulación tetánica de las fibras corticoestriatales: este LTP involucra una potenciación de un componente despolarizante glutamatérgico cortico/tálamo-estriatal y un componente hiperpolarizante intraestriatal gabaérgico (Suzuki y col. 2001).

1.6.2. Receptores de glutamato

La transmisión sináptica mediante los receptores de glutamato provee la conducción excitatoria para las vías formadas por las proyecciones neuronales que conectan las principales regiones del cerebro (Roberts y col. 1981). Estos receptores están categorizados dentro de dos grupos de receptores nombrados como receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR, acoplados a canal iónico) y metabotrópicos (mGluR, acoplados a segundos mensajeros) (Nakanishi 1992, Hollmann y Heinemann 1994, Nakanishi 1994). Ambos tipos de receptores están diferencialmente distribuidos en sitios pre y postsinápticos para contribuir a la comunicación neuronal y procesamiento de señales, funciones que determinan la formación del aprendizaje y la memoria (Storm-Mathisen y col. 1983). De esta manera, estos receptores cumplen un importante rol en plasticidad y desarrollo neuronal y neurodegeneración (Mayer y Westbrook 1987, Bliss y Collingridge 1993, Nakanishi y Masu 1994).

La transmisión rápida es mediada por tres clases principales de iGluR, receptores AMPA (AMPA-Rs), kainato (KA) y NMDA (NMDA-Rs), nombrados según los agonistas que los activan. Ya que sólo pocos agentes farmacológicos distinguen entre AMPA-Rs y KA se los llama receptores no-NMDA. Los iGluRs son canales iónicos tetra o pentaméricos compuestos de subunidades específicas que pueden formar homo o heterómeros. Cada subunidad tiene un extremo N-terminal extracelular, mientras que el extremo C-terminal está expresado intracelularmente (Hollmann y Heinemann 1994). Cuatro dominios hidrofóbicos han sido identificados, de los cuales tres forman segmentos transmembrana y uno forma un loop dentro de la membrana y alinea el poro del canal (Hollmann y col. 1994). Al momento, diferentes subunidades son conocidas para cada clase de iGluR, participando en su diversificación mediante mecanismos de splicing alternativo del RNA y editing (Seeburg 1993).

Los mecanismos de transmisión mediante los mGluRs son más lentos y modulatorios. Si bien dichos receptores poseen siete regiones transmembrana, similar a otros receptores acoplados a proteína G, sólo existe similitud en la secuencia aminoacídica con los receptores GABA_B. Poseen un extremo N-

terminal extracelular, un dominio heptahelicoidal transmembrana y un extremo C-terminal intracelular variable en longitud.

Los mGluRs están integrados por ocho diferentes subtipos (mGluR1-mGluR8) (Nakanishi 1994, Pin y Duvoisin 1995). Los ocho subtipos de esta familia de receptores son clasificados en tres grupos acorde a sus similitudes de secuencia, mecanismo de transducción de señal y selectividad por agonistas (Nakanishi 1994, Pin y Duvoisin 1995). El grupo I incluye mGluR1 y 5; grupo II, incluye mGluR2 y 3 y el grupo III incluye mGluR4, 6, 7 y 8 (Gubellini y col. 2004).

1.6.3. El receptor NMDA: estructura, localización y farmacología

Mientras que los receptores AMPA son de mayor importancia general en la transmisión sináptica *per se*, los receptores NMDA son los receptores clásicamente asociados a procesos de aprendizaje y memoria.

Desde los trabajos pioneros de Curtis y colaboradores (1959), se ha demostrado que el NMDA posee un canal ionotrópico con una cinética relativamente lenta, permeable a iones Ca^{++} además de Na^+ y K^+ . El canal es más complejo que los receptores AMPA o KA. Contiene un sitio de unión a Mg^{++} dependiente de voltaje, el cual mantiene al poro inactivo en el reposo y es liberado por la despolarización post-sináptica (Nowak y col. 1984), es por ésto que se lo llama detector de coincidencia en el SNC. Otros sitios moduladores como el sitio de unión al co-agonista glicina (y serina) y la modulación alostérica por poliaminas o inhibición por zinc son de gran interés para propósitos experimentales.

Los receptores NMDA funcionales están compuestos por subunidades heteroméricas, de las cuales existen tres clases diferentes: NR1 con ocho variantes de splicing, NR2A-2D (Moriyoshi y col. 1991, Gasic y Hollmann 1992, Meguro y col. 1992, Nakanishi y col. 1998) y NR3 (Sun y col 1998) que son codificadas por distintos genes. Mientras que la subunidad NR1 se puede ensamblar como receptor homomérico *in vitro*, los receptores NMDA funcionales son heteroméricos. Estos receptores están combinados por la

subunidad NR1 con al menos una de las subunidades NR2 (Moriyoshi y col. 1991, Gasic y Hollmann 1992, Meguro y col. 1992, Nakanishi y col. 1998) y/o NR3 (Sun y col. 1998, 2000).

NR1 es una subunidad fundamental ya que forma el canal funcional del receptor (Meguro y col. 1992), las subunidades NR2 confieren una variabilidad funcional al receptor y tienen una función moduladora sobre la actividad del canal (Moriyoshi y col. 1991, Meguro y col. 1992). Las NR2 expresadas solas no forman canal funcional, pero potencian y diferencian la actividad del receptor en la formación heteromérica con NR1. El sitio de unión a glicina se encuentra en la subunidad NR1, mientras que las subunidades NR2 y NR3 proveen los sitios de unión al glutamato y modulan la permeabilidad al Ca^{2+} , sensibilidad al Mg^{2+} y conductancia (Figura 3).

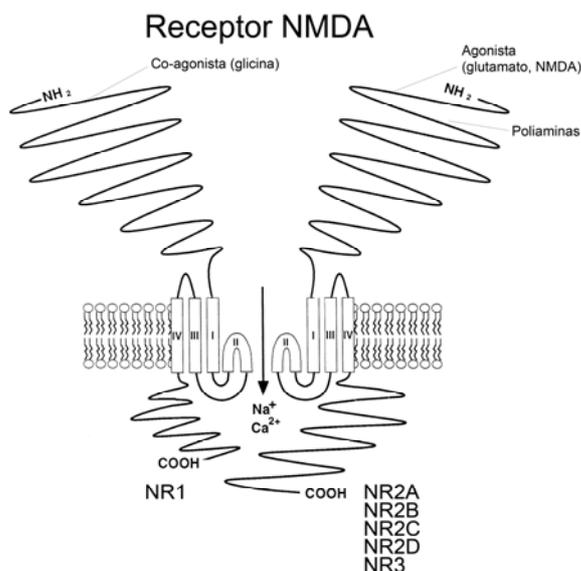


Figura 3. Modelo estructural del receptor NMDA. Aquí se puede observar el sitio de unión al co-agonista sobre la subunidad NR1, mientras que el glutamato se une a las subunidades NR2 y NR3.

Ensayos de unión a ligando han demostrado que los receptores NMDA presentan una distribución heterogénea en el cerebro, en particular con altos niveles en el hipocampo, tálamo y corteza y una menor expresión en los ganglios basales, cerebelo y médula espinal (Ozawa y col. 1998). En el cuerpo estriado, tanto las neuronas proyectivas como las interneuronas reciben inputs sinápticos de áreas corticales motoras y ambos tipos neuronales poseen receptores NMDA (Smith y col. 1998).

Numerosos agonistas y antagonistas sintéticos para los receptores NMDA han sido desarrollados dirigidos al sitio de unión a agonista, al de unión a glicina (co-agonista), al sitio de unión al poro y sitios moduladores (polyaminas, Zn^{++}) (Jane y col. 1994). Varios agonistas poseen mayor afinidad que el NMDA en sí, pero sólo son relevantes para ciertos estudios comportamentales como la activación de los NMDARs que produce epilepsia (Clark y col. 1994) y muerte celular, una metodología común para inducir lesiones neurotóxicas. Así también, agonistas para el sitio de unión a polyaminas como espermina, espermidina e histamina (Vorobjev y col. 1993) se han vuelto herramientas populares en la investigación de la función de los NMDARs.

El antagonista competitivo más utilizado es AP-V, posee muy baja biodisponibilidad pero es muy útil en estudios comportamentales en animales (Davies y col. 1981). El antagonista no-competitivo más conocido es MK-801 (Wong y col. 1986), que se une al receptor de forma dosis-dependiente bloqueando el poro y posee alta biodisponibilidad. Sin embargo, su uso terapéutico es escaso ya que dosis elevadas producen ataxia. Últimas investigaciones farmacológicas han generado alternativas más seguras como la memantina.

1.6.4. El receptor NMDA y actividad motora

Se ha visto que muchas drogas, particularmente cuando son aplicadas sistemáticamente, pueden afectar la actividad motora. Con respecto al aprendizaje y formación de memoria, la adaptación a largo plazo a un nuevo ambiente es una de las formas más elementales de aprendizaje no asociativo evaluando la actividad motora. Ciertos autores han informado que la administración intrahipocampal del antagonista AP-V pocos minutos antes, o inmediatamente después del entrenamiento, perjudicó la adaptación testada 24 horas después (Vianna y col. 2000). Otros autores realizaron un ensayo similar pero colocando una baja dosis de MK-801, este antagonista no afectó la adaptación dentro de cada sesión en un test de campo abierto, sin embargo, bloqueó la memoria a largo plazo medida al día siguiente mediante una prueba de retención (Carey y col. 1998). También se han publicado trabajos en los

cuales se evidencia un efecto de hiperactividad luego de un tratamiento sistémico con MK-801 debido a su acción a nivel del núcleo accumbens (Mele y col. 1996). Los efectos del MK-801 observados en cuerpo estriado también explican los déficits de interpretación en tareas de tiempo de reacción en ratas, e implican una cercana interacción con el sistema dopaminérgico (Baunez y col. 1994).

El rol de los NMDARs en el procesamiento de las funciones motoras en cuerpo estriado también ha sido establecido por Thanos y col. (1992). En esos estudios en roedores, la microinyección directa del agonista NMDA dentro del estriado indujo un incremento dosis-dependiente en el movimiento rotatorio contralateral. Estos estudios también mostraron que los efectos motores del glutamato sobre los NMDARs en el estriado requieren la estimulación concomitante de los receptores de dopamina en la misma región. Asimismo, la administración unilateral estriatal de un oligonucleótido específico antisentido de la subunidad NR1 produjo una rotación ipsilateral en ratas tratadas con apomorfina (Lai y col. 2000).

De esta manera, los receptores NMDA son considerados uno de los mayores grupos de receptores de glutamato involucrados en la regulación motora en el estriado (Thanos y col. 1992, Götz y col. 1997).

1.6.5. Plasticidad y expresión diferencial de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo postnatal

Desde que se han descubierto los receptores NMDA han sido relacionados con plasticidad dependiente de actividad. La participación de los NMDARs en procesos plásticos ha sido extensamente estudiada en el desarrollo de la plasticidad cortical visual, donde inicialmente se observó que el bloqueo de estos receptores bloquea los efectos de la deprivación monocular (Bear y col. 1990). Una dificultad con el bloqueo farmacológico de los NMDARs es que éste significativamente afecta la conducción de actividad visual, pero el uso de diferentes antagonistas del receptor (Daw y col. 1999) u oligonucleótidos antisentido para reducir la expresión de la subunidad NR1 se ha sobrepuesto a

este problema. Demostrándose así que es posible bloquear los efectos de la privación monocular sin afectar la respuesta visual (Roberts y col. 1998) y confirmando la intervención del NMDAR en la plasticidad cortical visual.

Los NMDARs son regulados durante el desarrollo y su expresión es modificada por la actividad eléctrica (Chen y col. 2000). En particular, su composición de subunidades varía en la corteza visual cambiando de una presencia dominante de receptores conteniendo la subunidad NR2B a una alta cuantía de receptores conteniendo la subunidad NR2A con un curso temporal paralelo al desarrollo cortical visual y al período crítico visual. La expresión de la subunidad NR2A se correlaciona con un acortamiento progresivo de la corriente NMDA. El rearrreglo causado por la oscuridad retarda la expresión de la subunidad NR2A sugiriendo que el pasaje de NR2B a NR2A está relacionado al desarrollo cortical y posiblemente, a la finalización del período crítico y la plasticidad visual (Roberts y Ramoa 1999, Berardi y col. 2000).

En el sistema olfativo en ratas ciertos autores propusieron y corroboraron la hipótesis que si el aprendizaje induce un incremento de la subunidad NR2A con respecto a NR2B, entonces el mantenimiento de la memoria puede ser debido a un incremento en el umbral para un posterior refuerzo sináptico. El incremento en la relación NR2A/NR2B resulta en un acortamiento de la corriente postsináptica excitatoria mediada por el NMDAR, lo cual puede inducir a la plasticidad sináptica NMDA-dependiente durante el aprendizaje, y servir para mantener la memoria codificada por la experiencia (Quinlan y col. 2004).

Se conoce que en diferentes regiones del cerebro hay distintos patrones de expresión de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo. Se ha postulado que esta expresión posee diversos roles fisiológicos en relación a la maduración del sistema nervioso como migración neuronal, sobrevida y plasticidad (Komuro y Rakic 1993, Michaelis 1998, Ikonomidou y col. 1999). Además, las subunidades NR median la excitotoxicidad por glutamato que se cree es la causa de muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas, como enfermedad de Parkinson, en los ganglios basales (Blandini y col. 1996).

Durante el desarrollo postnatal Wenzel y col. (1997) han determinado los niveles de expresión de las subunidades NR2A-C en cerebro de rata mediante la técnica de Western blot. En sus experimentos encontraron que durante el desarrollo (PN 0, 5, 10, 21 y adulto) la expresión de las subunidades NR2A y NR2B fue bifásica, ambas subunidades van incrementando su expresión hasta alcanzar un pico al PN 21 y disminuyen en el adulto. NR2C incrementa su expresión entre PN 10 y 21 y permanece constante hasta la adultez.

En cuanto a los patrones de expresión en cuerpo estriado durante el desarrollo (PN 1, 5, 10, 16, 26 y adulto) NR2A se encuentra ausente desde el nacimiento hasta que comienza a ser detectable al PN 16, al PN 26 alcanza un máximo y levemente decae en el adulto. En cambio NR2B posee una expresión moderada al PN 1 y se va enriqueciendo hasta alcanzar un máximo al PN 26 que se mantiene en el adulto (Portera-Cailliau y col. 1996). Otros autores, mediante inmunohistoquímica, han evaluado a la subunidad NR1, la cual exhibe un patrón en aumento hasta el PN 14 y ese valor es mantenido en el adulto (Nansen y col. 2000). Hasta esa edad postnatal, el estriado muestra sólo una leve respuesta electrofisiológica al agonista NMDA, sugiriendo así que los NMDARs aún están en desarrollo (Colwell y col. 1998). Hacia el PN 14 la respuesta electrofisiológica y la subunidad NR1 han madurado.

Al ser evaluados en un mismo estudio, los patrones de expresión del RNAm y la inmunoreactividad de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en cuerpo estriado los resultados obtenidos fueron bastante controversiales. Lau y col. (2003) analizaron el patrón de expresión del NMDAR en los días postnatales 1, 7, 14 y adulto (> 90 días), obteniendo un máximo de expresión del RNAm al PN 7 para las tres subunidades antes mencionadas. Sin embargo al evaluar las proteínas, el patrón de inmunoreactividad es más complejo que la expresión del RNAm. En este caso la máxima inmunoreactividad para NR1 se produce al PN 1 y 14, a diferencia de esta subunidad, NR2B presenta una tendencia completamente opuesta. La subunidad NR2A se encuentra en baja expresión desde el PN 1 y alcanza un máximo en el adulto, este dato es consistente con investigaciones previas (Portera-Cailliau y col. 1996, Wenzel y col. 1997).

De esta manera se observan patrones diferenciales de expresión entre las diferentes subunidades en el estriado durante el desarrollo postnatal en términos de la expresión del RNAm e inmunoreactividad.

1.6.6. Moléculas de transducción de señales en la sinapsis glutamatérgica

El glutamato es liberado en “paquetes” desde el terminal presináptico y la membrana postsináptica está especializada para la recepción de la transmisión de señales mediada por el glutamato y la transducción de esas señales dentro de la neurona postsináptica. Conteniendo una gran concentración de receptores y proteínas de señalización y asociadas al citoesqueleto, la porción de membrana postsináptica es visible con microscopía electrónica como un engrosamiento (aprox. 30 nm) conocida como densidad postsináptica (PSD). La fracción PSD contiene un grupo de proteínas fuertemente unidas que forman un complejo de señalización principalmente asociado con el receptor NMDA en neuronas del SNC (Kennedy 1998). La densidad postsináptica es una especialización de fibras del citoesqueleto que se adhiere a la membrana postsináptica en sitios de cercana aposición al terminal presináptico. Las densidades postsinápticas más predominantes son las asociadas con sinapsis glutamatérgicas (Landis y col. 1974).

Los receptores NMDA median la transducción de señales a partir de la entrada de Ca^{++} y su unión a proteínas citoplasmáticas (Husi y col 2000). El aislamiento bioquímico del receptor a partir de cerebro de ratón, mostró que éste se encuentra físicamente acoplado a una compleja red de proteínas de señalización (Husi y col. 2000, Husi y Grant 2001). Dentro de este conjunto de proteínas hay reguladores de la transmisión sináptica y proteínas del citoesqueleto, sugiriendo que la actividad del NMDAR puede regular tanto la estructura dendrítica como la fuerza sináptica (Husi y col. 2000). PSD-95, proteína de andamiaje, es un miembro de la familia de proteínas de membrana asociadas a guanilato kinasa (MAGUK). Posee tres dominios que median interacción proteína-proteína llamados PDZ (Kornau y col. 1995), se encuentra altamente concentrada en los sitios sinápticos y co-localiza con los receptores

NMDA (Kornau y col. 1995). Esta proteína une los receptores NMDA con una variedad de proteínas de citoesqueleto. Bajo ciertas circunstancias, PSD-95 y el receptor NMDA se encuentran en asociación directa mediante el extremo C-terminal de la subunidad NR2B (Kornau y col. 1995). En cultivos celulares se observó que esta proteína forma grupos con los receptores NMDA cuando son expresados juntos (Niethammer y col 1996).

Previamente, se ha demostrado en ratones que PSD-95 regula LTP en corteza e hipocampo (Migaud y col. 1998, Stein y col. 2003). LTP en el núcleo accumbens es aumentado en ese modelo de ratones y se correlaciona con una disminución en la expresión de PSD-95, sugiriendo un rol para el LTP en la sensibilidad a dopamina (Yao y col. 2004). Estos autores también utilizaron ratones con una mutación que anula el gen de PSD-95, en consecuencia se produce un aumento de LTP, aumento del efecto motor agudo de la cocaína pero se anula la plasticidad en respuesta a un tratamiento crónico (Yao y col. 2004).

1.7. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

- I) En función de lo expuesto, en primer lugar, se propone dilucidar la ontogenia completa del receptor NMDA durante el desarrollo en cuerpo estriado de rata, examinando los cambios en el patrón de organización y expresión celular de las distintas subunidades. Este objetivo resulta de suma importancia ya que no se ha descrito en cuerpo estriado de rata la ontogenia de este receptor y la expresión de sus subunidades durante el período de plasticidad dependiente de actividad del sistema colinérgico-dopaminérgico (Ibarra y col. 1995, 1996), entre el día PN30 y 37.

- II) En segundo lugar, se analizará si la estimulación motora produce cambios permanentes en el número de receptores NMDA por técnicas de unión a ligando específico y en la expresión genética de sus subunidades, con el fin de establecer la existencia de un período de ajuste sináptico dependiente de actividad para el sistema glutamatérgico. Asimismo se intentará correlacionar con proteínas marcadoras de pre y postsinapsis.

De esta manera, se podrá establecer si los cambios en los niveles del receptor se correlacionan con modificaciones de la expresión genética (mediante el análisis de los niveles de ARN mensajero de las subunidades NR1, NR2A Y NR2B). O bien si se está produciendo una modificación de la densidad sináptica del número de receptores NMDA. Estos estudios permitirán mejorar nuestra comprensión de los procesos celulares y moleculares involucrados en los cambios permanentes que se observan durante un período crítico.

METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1. ANIMALES

2.1.1. Animales utilizados

El modelo experimental utilizado ha sido rata macho de la cepa Sprague-Dowley, esta cepa es originaria del Instituto Holtzman de EE.UU. Los animales fueron adquiridos al Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y al Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME).

2.1.2. Mantenimiento de los animales

Los animales han sido mantenidos en condiciones ambientales controladas. La temperatura ha sido mantenida en 20-22°C y han tenido un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas iniciando el período de luz a las 20.00 horas. En las jaulas contaron con suministro de agua y alimento *ad libitum* y una adecuada disponibilidad espacial.

En todos los casos los animales han sido manejados de acuerdo al tratamiento humano de animales de laboratorio, tal como lo establecen las pautas protectivas del US National Institutes of Health (NIH).

2.2. ENTRENAMIENTO

2.2.1. Test de Entrenamiento Circular (TEC)

Para realizar este tipo de entrenamiento se empleó un aparato que consta de una pista circular de 8 cm de ancho construida con dos cilindros de metal de 31 cm de alto y 1 m de circunferencia (Figura 4). Estos cilindros de 24 cm y 40 cm de diámetro fueron colocados en forma concéntrica sobre una base de madera y el piso de la pista fue recubierto con goma antideslizante. Todo el aparato ha sido pintado de color negro.

La pista de entrenamiento consta de cuatro emisores de rayos infrarrojos colocados por dentro del cilindro interno y cuatro sensores infrarrojos colocados por fuera del cilindro externo en forma apareada con los emisores. Cada par fue ubicado a 2 cm del piso y a 90° uno con respecto al otro, numerados de 1 a 4 en sentido horario. Los cuatro sensores han sido conectados a una unidad de memoria en forma secuencial, que computa las interrupciones del haz infrarrojo. Para que se compute la activación de un sensor es necesario que el sensor anterior haya sido activado (para activar el sensor 4 se debió haber activado el 3 y para ésto el 2, sucesivamente). A medida que el animal va completando una vuelta en sentido correcto (horario), los sensores se van activando. Cada vuelta completa equivale a un metro recorrido. El aparato computa una vuelta cuando los cuatro sensores han sido activados secuencialmente (1 a 4). Cuando el sensor 3 es activado se activa el dispensador de la recompensa que libera una gota de sacarosa 5 % a la altura del sensor 4. Al llegar el animal a este sensor, el mismo es activado, el animal bebe la gota de agua azucarada y una vuelta es computada por el contador de vueltas. El animal puede moverse libremente en ambos sentidos (horario y antihorario) dentro del aparato, pero sólo recibirá la recompensa hídrica si realiza una vuelta completa en el sentido correcto, ya que si el animal se mueve en sentido antihorario el circuito de cómputo es reseteado y no se registra el trayecto recorrido en esa vuelta. En las condiciones establecidas en este trabajo, la gota liberada tuvo un volumen aproximado de 50 µl.

El test consistió de una serie de sesiones consecutivas recibiendo cada animal una única sesión diaria.

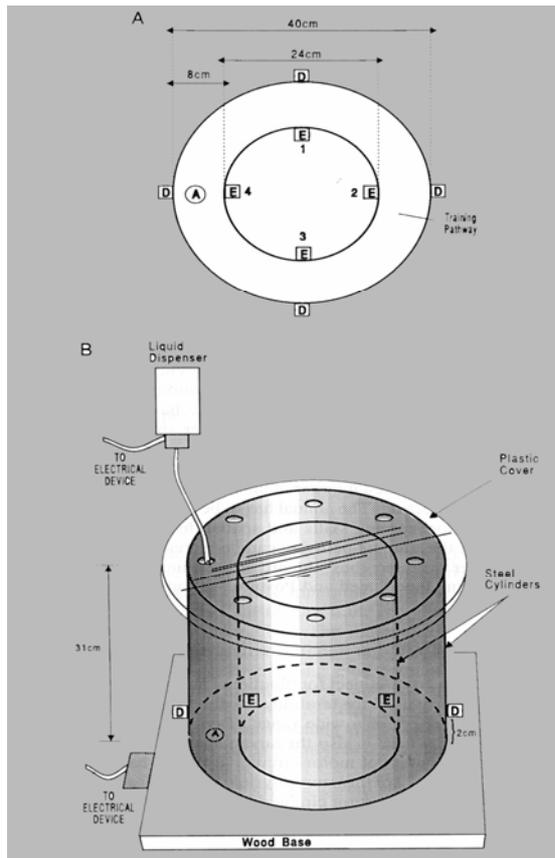


Figura 4: Esquema del aparato utilizado en el Test de Entrenamiento Circular. *A)*, vista desde arriba con las dimensiones y la localización de los diodos emisores de luz infrarroja. *B)*, vista frontal del aparato.

E y D: detectores infrarrojos, *A:* sitio donde se recibe la recompensa hídrica.

2.2.2. Protocolo de Entrenamiento

Los animales utilizados comenzaron el entrenamiento al día postnatal correspondiente (PN 20, 30 o 40) con el objetivo de acumular un total de aprox. 900 vueltas (900 metros recorridos). Todos los animales fueron privados de agua 24 horas antes de comenzar la sesión de aprendizaje (S0), sólo recibieron agua durante el tiempo que duró el entrenamiento. La S0, de 30 minutos de duración, fue utilizada para que la rata aprendiese el sentido de giro en el cual recibiría la recompensa. Durante los primeros 10 min cada animal fue recompensado por cada cuarto de vuelta recorrido en sentido correcto, en los 10 min siguientes la recompensa es administrada por cada media vuelta y en los 10 min finales por cada vuelta completa.

Se estableció como criterio de finalización de cada sesión de entrenamiento la ejecución de un número determinado de vueltas. Durante las 3 primeras sesiones (S1 a S3) los animales realizaron 100 vueltas (100 metros) en cada sesión y 150 vueltas en las 4 últimas sesiones (S4 a S7), en 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.

Los grupos de animales entrenados, con sus respectivos controles, fueron sacrificados en el PN 74.

2.2.3. Animales controles

Los animales controles fueron sometidos al mismo esquema de deprivación hídrica, pero recibieron una ración diaria de agua equivalente al promedio de la ingesta hídrica de los animales entrenados. Dichos controles, se colocaron en el aparato para experimentar la habituación pero no fueron entrenados. El tiempo de permanencia de los controles dentro del aparato en cada sesión de entrenamiento fue equivalente al promedio de permanencia de los animales entrenados.

2.2.4. Criterios de descarte

En todos los casos, se registró diariamente el peso de los animales y aquellas ratas con una disminución de más de un 10 % de su peso fueron descartadas 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. Asimismo, los animales que no alcanzaron a realizar 100 vueltas en ninguna de las sesiones restantes también fueron separados con el objeto de homogeneizar la cantidad de actividad acumulada.

2.3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS

2.3.1. Disección del cuerpo estriado

En los tiempos indicados en cada diseño experimental (PN 74 y correspondientes PNs para la ontogenia) los animales fueron sacrificados por decapitación mediante el empleo de guillotina. Luego se realizó, en forma inmediata, un corte longitudinal de la piel en la línea media del cráneo dejando al descubierto la calota. Posteriormente se efectuó un corte 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 al espacio subaracnóideo y poder luego remover la calota sin dañar el cerebro. Se realizaron dos cortes de la calota a la altura de la comisura parieto-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 y colocado con la cara ventral hacia arriba en una placa de Petri ubicada sobre hielo. A continuación, se realizaron dos cortes transversales con bisturí, uno por delante de los tubérculos olfatorios y otro por detrás. Luego se disecó el cuerpo estriado de los animales, en una primera etapa se trabajó con estriado derecho e izquierdo por separado con el objetivo de visualizar posibles efectos asimétricos. Descartado ésto, ambos estriados fueron procesados juntos. Siempre se realizó una separación de un hemiestriado para fraccionamiento subcelular y el otro hemiestriado para extracción de RNA de cada grupo experimental. A su vez, de manera aleatoria se seleccionó cada hemiestriado a ser utilizado para ensayos de unión a ligando (binding) y Western blot o extracción de RNA. En la Figura 5 se ejemplifica el sentido del corte realizado para la separación de cada hemiestriado.

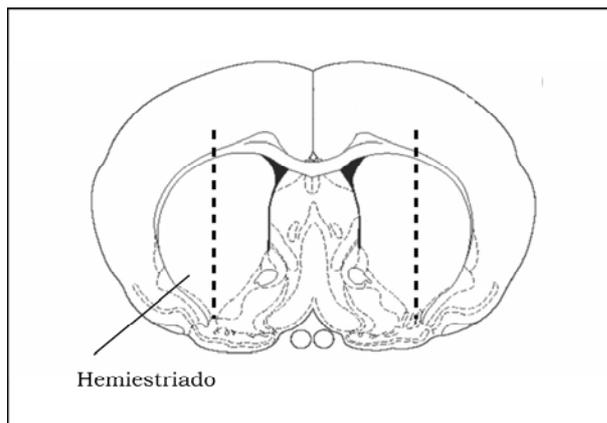


Figura 5: Esquema del corte realizado para separar cada hemiestriado. Cada hemiestriado fue obtenido al realizar un corte en sentido dorso-ventral de cada estriado (línea punteada). Cada hemiestriado de cada lado (derecho e izquierdo) se utilizó para binding o extracción de RNA. Esquema modificado de una sección coronal de cerebro de rata del atlas de Paxinos y Watson (1996).

2.3.2. Fraccionamiento subcelular para determinaciones neuroquímicas

Luego de la disección del cuerpo estriado, éste fue pesado y fraccionado para obtener la fracción de membrana sináptica para la realización de ensayos de unión a ligando. El fraccionamiento se realizó según el protocolo de Azcurra y De Robertis con algunas modificaciones (1967). El tejido fue homogeneizado al 5 % (p/v) en buffer frío (Tris-HCl 20 mM, sacarosa 0.32 M, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.4) en hielo, en un homogeneizador polytron de vidrio con vástago de teflón (clearance 0.28 mm) mediante 40 pases a 1300 rpm. El homogenato inicial se centrifugó 10 min a 1090 x g, el pellet se lavó 2 veces y luego se descartó. Los sobrenadantes postnucleares se mezclaron y centrifugaron 30 min a 13000 g. El pellet obtenido corresponde a **sinaptosomas**, luego de dos lavados, este pellet fue resuspendido en una solución hipo-osmótica (Tris-HCl 5 mM, CaCl₂ 50 µM, pH 8.1) y vertido en el homogeneizador de vidrio donde se realizaron 30 pases con el vástago de teflón. El objetivo fue la ruptura por shock osmótico de dichos sinaptosomas sellados en la fracción precedente.

Luego del shock osmótico, el nuevo homogenato fue centrifugado durante 30 min a 20200 g. Luego de un lavado, el pellet fue resuspendido en 1-2 ml de buffer de homogenización y cargado sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 0.8 M/1 M/1.2 M en buffer de homogenización, formado con 2.5 ml cada capa del gradiente. Los gradientes fueron centrifugados 80 min a 100000 g, la interfase 1 M/1.2 M fue recuperada y resuspendida en un dounce con 30 pases del vástago. Para la resuspensión de la interfase se utilizó un buffer

distinto al de homogenización, buffer A (Tris-HCl 50 mM, sacarosa 0.32 M, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.4). Una vez resuspendida la interfase, se centrifugó 80 min a 150000 g, el pellet obtenido fue resuspendido en un pequeño volumen del buffer de homogenización (Tris-HCl 20 mM, sacarosa 0.32 M, EDTA 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.4), separado en alícuotas y almacenado a -70 °C. Esta fracción a ser utilizada corresponde a **membrana sináptica 1 M**.

2.3.2.1. Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Lowry y colaboradores (1951) empleando el reactivo de Folin y como estándar seroalbúmina bovina, BSA (fracción V).

2.3.3. Extracción de RNA

El tejido disecado fue homogeneizado con un Tissue-tearor en 1 ml de Trizol (Gibco BRL) por cada 100 mg de estriado. Luego de 5 min de incubación a 30 °C se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por ml inicial de Trizol a la muestra homogeneizada. Cada tubo fue incubado 3 min a 30 °C y centrifugado 15 min a 12000 x g con una temperatura de 4 °C. Luego de la centrifugación la fase superior acuosa conteniendo el RNA, fue transferida a otro tubo al cual se adicionó 0.5 ml de alcohol isopropílico por ml inicial de Trizol. Se realizó una incubación de 10 min a 30 °C y se centrifugó a 4 °C cada tubo durante 10 min a 12000 x g para precipitar el RNA. El sobrenadante fue removido y el RNA fue lavado con 1 ml de etanol 75 % por ml inicial de Trizol, mezclado vigorosamente y nuevamente centrifugado con 4 °C durante 5 min a 7500 x g. Se secó el precipitado de RNA evitando la deshidratación total y fue disuelto en agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) 0.1 % (v/v), incubando 10 min a 55 °C.

El RNA fue cuantificado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, alicuotado y guardado a -80 °C. La relación de absorbancia 260/280 nm se utilizó para determinar el índice de pureza.

Para verificar la integridad del RNA cada muestra fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml), buffer de corrida TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM).

Todos los reactivos, excepto el Trizol, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

El material de vidrio y plástico utilizado fue tratado con DEPC y autoclavado.

2.4. MEDICIÓN DE NEURORECEPTORES

2.4.1. Ensayos de unión de [³H]MK-801 a los receptores NMDA

2.4.1.1. Determinación del número

Para establecer el número de receptores NMDA se determinó la máxima capacidad de unión ($B_{máx}$) en la fracción de membrana sináptica 1 M. Esto se llevó a cabo mediante la técnica de ensayos competitivos a saturación empleando el ligando específico [³H]MK-801 (PerkinElmer Life Sciences, Inc.), con una actividad específica de 17.1 Ci/mmol, mediante modificación de la técnica de Wong y colaboradores (1988).

Para ello se utilizaron 15 µg de proteínas de la fracción que fueron incubados en buffer Tris-Acetato 5 mM, pH 7.4 adicionado con los agonistas Glutamato y Glicina (50 µM). Esta incubación se realizó en presencia de una concentración final de 80 nM de [³H]MK-801 durante 3 hs a 28 °C bajo agitación. Cada muestra se ensayó por triplicado y además por duplicado se determinó la unión inespecífica del ligando a la muestra en presencia de 100 µM de MK-801 no radioactivo, este valor representó aproximadamente el 10 % de la unión total. El volumen final de incubación fue de 0.5 ml.

Luego de la incubación, el ligando unido fue separado del ligando libre realizando filtración al vacío utilizando un aparato de filtración de 8 bocas tipo Millipore y usando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B, con una velocidad de flujo de 5 ml/min. La incubación se frenó con el agregado de 3 ml del buffer de incubación frío al tubo de ensayo, este se volcó sobre el filtro correspondiente y se lavó 2 veces con 4 ml y 5 ml del mismo buffer frío. Una

vez realizado el proceso de filtrado, los filtros se colocaron en viales de vidrio y fueron secados en estufa a 40 °C durante 12 hs. Luego se cargó a cada vial 10 ml de líquido de centelleo conteniendo 18 mM de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 0.27 mM de 2,2'-p-fenilén-bis(5-feniloxazol) (POPOP) en tolueno. Los distintos viales se mantuvieron a 20 °C durante 30 min en oscuridad antes de realizar la medición de radioactividad remanente en los filtros en un contador de centelleo líquido con una eficiencia del 40-50 %.

2.4.1.2. Determinación de la afinidad

Como parámetro de afinidad de los receptores NMDA se determinó la constante de disociación aparente (K_d) en las mismas muestras en que se midió el número de receptores, utilizando la técnica de Scatchard (1949). Las muestras fueron incubadas, como se ha detallado en el apartado anterior, pero con cantidades decrecientes de [³H]MK-801 (80, 60, 30, 15, 5, 2.5 y 1 nM). La unión inespecífica del ligando se realizó en presencia de 100 μM de MK-801 no radioactivo. El proceso de filtración, secado y conteo es el mismo que el explicado anteriormente. Cada punto de la curva fue realizado por triplicado y por duplicado su inespecífico.

2.4.2. Cálculo de $B_{m\acute{a}x}$ y K_d

Los parámetros $B_{m\acute{a}x}$ y K_d fueron obtenidos empleando el programa LIGAND (Munson y Rodbard 1980). Todos los datos de las curvas de ensayos competitivos a saturación ajustaron al modelo de un sitio receptor.

Para el cálculo de estos parámetros se utilizaron las desintegraciones por minuto (DPM) las cuales se obtienen conociendo las cuentas por minuto (CPM) que detecta el contador de centelleo líquido y la eficiencia (Ef) de conteo a partir de la relación:

$$\mathbf{DPM = CPM/\%Ef}$$

Incubando en ausencia del desplazante no radioactivo se obtienen las DPM totales. Las DPM obtenidas a partir del tubo incubado en presencia del desplazante MK-801 corresponden a la unión inespecífica del ligando al tejido.

Las DPM correspondientes a la unión específica del ligando al receptor se calculan de la siguiente forma:

$$\text{DPM específicas} = \text{DPM totales} - \text{DPM inespecíficas}$$

La cantidad molar correspondiente a las DPM de cada medición se calculan a partir de la actividad específica del ligando utilizado. Los resultados obtenidos se expresan como el cociente de pmoles de receptor/mg de proteína.

2.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RNAm DEL NMDAR MEDIANTE RT-PCR

2.5.1. Síntesis de DNA copia (cDNA)

Para la transcripción reversa (RT) se utilizaron 2 µg de RNA de cada muestra. Mix de reacción: buffer AMV-RT 4 µl (5 X), dNTPs 2 µl (10 mM), RNAsin 1 µl (40 U/µl), hexámeros al azar 0.5 µl (100 µM), transcriptasa reversa AMV 0.2 µl (10 U/µl). En un tubo Eppendorf estéril de 0.2 ml se colocó el RNA y un determinado volumen de H₂O-DEPC para completar, una vez agregado el mix de reacción, a 20 µl de volumen final y se efectuaron los siguientes pasos:

- ✗ 70 °C, 10 min, desnaturalización del RNA
- ✗ 0 °C, 5 min, se evita renaturalización
- ✗ se adiciona la mezcla de reacción
- ✗ 48 °C, 45 min, annealing de hexámeros y síntesis el cDNA
- ✗ 95 °C, 5 min, inactivación de la enzima AMV-RT
- ✗ 0 °C, 5 min.

Los tubos conteniendo el cDNA fueron guardados a -20 °C.

La enzima y todos los reactivos fueron adquiridos de Promega Co. (Madison, WI, USA).

El material de plástico utilizado fue autoclavado.

2.5.2. Secuencias de los primers para PCR

Las secuencias de los primers específicos para las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA fueron las utilizadas por Lai y colaboradores (2000) y fueron adquiridos a Invitrogen Life Technologies. Para β -Actina fueron adquiridos a Promega Co. y para la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fueron desarrollados a partir de secuencias del Genbank. El producto de PCR de β -Actina y GAPDH fue utilizado para la normalización de los productos obtenidos, mediante la misma técnica, de las distintas subunidades.

Las secuencias de los primers son las siguientes:

Subunidad	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)
NR1	AAC CTG CAG AAC CGC AAG GCT TGA TGA GCA GGT CTA TGC	333
NR2A	TCC ATT CTT CTG TCA TCC TGC AAG ACC GTC TCT CAC TCT TGC	224
NR2B	TGC ACA ATTA CTC CTC GAC G TCC GAT TCT TCT TCT GAG CC	222
β-Actina	TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT CTT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG	285

2.5.3. RT-PCR de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del NMDA

El cDNA obtenido en la RT del RNA de las muestras fue amplificado usando la técnica de PCR.

Luego de la puesta a punto de la técnica (que consistió en determinar la concentración de Mg^{++} y temperatura de annealing adecuada para cada set de primers), se realizó la amplificación de las muestras con distinta cantidad de ciclos (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45) para determinar la zona de linealidad de la reacción y establecer así las condiciones en las cuales las variaciones sean detectables y semicuantificables (no debe existir efecto plateau en la amplificación).

Se utilizaron 2 μl de cDNA de cada muestra y se preparó un mix para cada par de primers (NR1, NR2A, NR2B y β -Actina).

Mix de reacción: buffer libre de Mg^{++} 5 μl (10 X), dNTPs 1 μl (10 mM), MgCl_2 1 μl (50 mM), de cada primer 1 μl (50 μM), Taq DNA Polimerasa 0.5 μl (5 U/ μl), H_2O bidestilada autoclavada para completar a 50 μl de volumen final. En un tubo Eppendorf estéril de 0.2 ml se colocó el cDNA y el mix de reacción y se efectuó el siguiente protocolo de amplificación:

- Desnaturalización general: 94 ° C, 2 min.
- Desnaturalización: 94 ° C, 40 seg.
- Annealing: 57 °C (NR1, NR2A, NR2B), 70 °C (β -Actina/GAPDH), 30 seg.
- Extensión: 72 °C, 30 seg.
- Extensión final: 72 °C, 10 min.

El control negativo fue realizado colocando una alícuota de RNA omitiendo el paso a cDNA para descartar posible contaminante con DNA genómico. El control de contaminación de la PCR fue realizado omitiendo el cDNA y reemplazándolo con un volumen equivalente de agua. Ambos controles se realizaron en todos los ensayos aunque no sean mostrados.

El buffer de reacción, el MgCl_2 y la Taq DNA Polimerasa fueron adquiridos de Invitrogen Life Technologies y los dNTPs de Promega Co. (Madison, WI, USA).

2.5.4. Separación del producto de RT-PCR mediante electroforesis

La evaluación semicuantitativa del producto de amplificación, de cada subunidad del NMDAR y de los genes de expresión constitutiva, obtenido en las curvas de ciclos fue realizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml), utilizando buffer de corrida TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) a 80 V durante 1 h. Cada producto de PCR fue identificado mediante la corrida en una de las calles de un marcador de peso molecular de 100 pb-1500 pb.

Una vez seleccionado el número de ciclos, se procedió a realizar las amplificaciones correspondientes bajo esas condiciones.

Tanto para el RNA como para los productos de amplificación, todas las corridas electroforéticas fueron fotografiadas con una cámara Polaroid MP-4 provista de un filtro rojo con película Polapán 667 colocando los geles sobre un transiluminador con luz U.V. de 300 nm.

2.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS

2.6.1. Western blot de PSD-95 y Sinaptofisina

Para estos ensayos se utilizó la misma fracción de membrana sináptica 1 M que para la medición de receptores NMDA correspondiente a los mismos animales controles y entrenados.

Alicuotas conteniendo 10 µg de proteínas para PSD-95, 4 µg para Sinaptofisina y 2 µg para Actina fueron colocadas con buffer de siembra 5X (Tris-HCl 120 mM pH 6.8, dodecilsulfato de sodio (SDS) 3 %, glicerol 10 %, β-mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0.1 %) y calentadas a 95 °C durante 5 min. Luego se colocaron en hielo y se cargaron en un gel de poliacrilamida (acrilamida 30 %-bisacrilamida 0.8 %) conteniendo SDS (SDS-PAGE). Los porcentajes del gel variaron acorde al tamaño de las proteínas, 10 % para PSD-95 y 15 % para Sinaptofisina y Actina. Siempre en una calle de cada gel se colocaron 5 µl de un estándar de peso molecular pre-teñido (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

La electroforesis de las proteínas se realizó a 130 V durante 2 hs en buffer de corrida 0.5 X (Tris 12.5 mM, Glicina 0.1 M, SDS 0.5 %, pH 8.3). Luego se efectuó la transferencia en frío de las mismas a una membrana de nitrocelulosa a 100 V durante 50 min en buffer de transferencia (Tris 20 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20 %). Finalizada la transferencia la calidad fue visualizada colocando las membranas en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 0.2 %, ácido tricloroacético 0.3 %). Luego las membranas se lavaron con agua bidestilada, se colocaron en buffer TTBS (Tris 100 mM, NaCl 0.9 %, Tween 20 0.1 %, pH 7.5) para su lavado final y se realizó el bloqueo de peroxidasas

endógenas durante 10 min en H₂O₂ (30 vol) 2 % preparada en TTBS. Esta incubación fue realizada a fin de inhibir peroxidasas endógenas que puedan estar presentes en las muestras ya que el sistema de revelado involucra la utilización de peroxidasa.

Tras sucesivos lavados se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos durante 1 h a temperatura ambiente en TTBS con 5 % de leche en polvo descremada. A continuación se realizó la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios anti PSD-95 (monoclonal ratón, 1:2500; Sigma, USA), Sinaptofisina (monoclonal ratón, 1:5000; Sigma, USA) y Actina (policlonal ratón, 1:1000; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA). Anti Actina fue utilizado como control interno para normalizar la cantidad de proteína cargada en cada calle. La incubación con los anticuerpos primarios fue realizada durante 12 hs a 4 °C en agitación constante. Pasado este tiempo, las membranas fueron lavadas en TTBS e incubadas con un anticuerpo secundario de cabra biotinilado anti IgG (1:1000; Sigma, USA) 40 min a temperatura ambiente para detectar las bandas inmunoreactivas. Luego de lavar con TTBS las membranas fueron incubadas con estreptoavidina (1:500; Sigma, USA) por 40 min a temperatura ambiente. Finalmente el revelado se realizó mediante una reacción con peroxidasa utilizando 3,3'-diaminobencidina (Sigma, USA) como cromógeno. Las membranas fueron secadas y escaneadas para su posterior semicuantificación.

Los controles negativos se realizaron omitiendo en determinadas calles el anticuerpo primario y reemplazándolo por TTBS.

2.7. SEMICUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR Y WESTERN BLOT

Las imágenes obtenidas de los geles (RT-PCR) y membranas (Western blot) fueron digitalizadas y la intensidad de fluorescencia o densidad óptica de cada banda fue semicuantificada por un programa analizador de imágenes (Bio-imaging analyzer BAS-1800 II; FUJIFILM v 3.12). Las intensidades relativas fueron promediadas y normalizadas con los productos de amplificación de β -Actina o con la proteína Actina para los experimentos de RT-PCR y Western

blot respectivamente. Los valores obtenidos fueron expresados como el promedio \pm SD.

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis de los datos de RT-PCR y Western blot los valores fueron expresados como promedio de las unidades arbitrarias relativizado al valor promedio de la banda control en cada caso con su respectivo desvío estándar. Para comparar los resultados estadísticamente, se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. Previo al análisis estadístico se verificó que los datos cumplieran con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

En todos los análisis, el nivel de aceptación fue $p < 0.05$.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. PROCESAMIENTO DEL CUERPO ESTRIADO PARA ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

3.1.1. Disección y fraccionamiento subcelular: medición del peso del tejido y concentración de proteínas

A partir de la disección del cuerpo estriado, tanto en los animales sacrificados a las distintas edades postnatales de la ontogenia como en aquellos que realizaron entrenamiento a distintas edades, se separó cada hemiestriado (ver apartado 2.3.1. y Figura 5). En este caso un hemiestriado de cada lado (derecho e izquierdo) fue utilizado para determinar el peso de dicha estructura y la concentración de proteínas. El otro hemiestriado se utilizó para la extracción de RNA.

MUESTRA	PESO (mg)	PROTEÍNAS ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido)
PN 6	41.5 \pm 2.1	0.10 \pm 0.025
PN 12	59 \pm 3.4	0.13 \pm 0.014
PN 20	77.6 \pm 1.5	0.20 \pm 0.019
PN 24	84.5 \pm 0.9	0.20 \pm 0.020
PN 28	84 \pm 2.7	0.22 \pm 0.026
PN 35	86 \pm 1.9	0.24 \pm 0.010
PN 40	78.7 \pm 3.3	0.23 \pm 0.023
PN 45	102 \pm 4	0.17 \pm 0.022
PN 60	99.3 \pm 2.8	0.23 \pm 0.018
PN 200	115.3 \pm 2.6	0.27 \pm 0.020

Tabla 1. Los valores corresponden al peso del estriado y cuantificación de proteínas en la fracción de membrana sináptica \pm desvío estándar. Cada valor de ontogenia corresponde al promedio de 3 estudios experimentales diferentes, $n = 8$ por ensayo. PN: día postnatal.

La Tabla 1 muestra el peso del cuerpo estriado de los animales utilizados para realizar la ontogenia y la cuantificación de proteínas totales de la fracción de membrana sináptica 1 M, sobre la cual se realizaron las determinaciones neuroquímicas. Se evaluó un total de 24 animales por edad en los 3 ensayos

realizados. Para todos los puntos de la ontogenia, ambos hemiestriados (derecho e izquierdo) fueron procesados juntos.

La Tabla 2 muestra el peso del cuerpo estriado y cuantificación de proteínas de la fracción de membrana sináptica 1 M de los animales entrenados al PN 20, 30 y 40; y controles respectivos.

El análisis comparativo no muestra diferencias en el peso ni en la concentración de proteínas entre los animales controles y entrenados en los esquemas evaluados.

	MUESTRA	PESO (mg)	PROTEÍNAS ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tejido)
Entrenamiento PN 20-27	Cd	38.5 ± 5.1	0.18 ± 0.020
	Ed	41.5 ± 4.0	0.19 ± 0.020
	Ci	40.6 ± 1.5	0.20 ± 0.018
	Ei	43.5 ± 2.2	0.20 ± 0.010
	C	84 ± 0.7	0.22 ± 0.013
	E	83.3 ± 1.2	0.24 ± 0.023
Entrenamiento PN 30-37	Cd	43.7 ± 3.3	0.23 ± 0.010
	Ed	42 ± 4	0.17 ± 0.024
	Ci	41.5 ± 2.1	0.21 ± 0.030
	Ei	40.4 ± 2.6	0.18 ± 0.017
	C	78.7 ± 4.6	0.19 ± 0.010
	E	79.3 ± 2.8	0.21 ± 0.027
Entrenamiento PN 40-47	Cd	43.6 ± 2.2	0.24 ± 0.018
	Ed	42.9 ± 1.6	0.18 ± 0.022
	Ci	42.5 ± 3.8	0.21 ± 0.027
	Ei	41.2 ± 2.3	0.20 ± 0.013
	C	80.4 ± 4.2	0.22 ± 0.020
	E	82.6 ± 3.7	0.20 ± 0.030

Tabla 2. Los valores corresponden al peso del estriado y cuantificación de proteínas en la fracción de membrana sináptica \pm desvío estándar. Cada valor de entrenamiento corresponde al promedio de 3 estudios experimentales, $n = 8$ animales entrenados y $n = 6$ animales control por estudio. Estos datos fueron obtenidos de animales sacrificados al PN 74.

PN: día postnatal, Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

3.1.2. Extracción de RNA: rendimiento, pureza e integridad

Se efectuó la extracción del RNA de los mismos animales para los cuales se realizó el fraccionamiento subcelular utilizando el hemiestriado restante.

Los grupos experimentales han sido divididos según ontogenia y entrenamiento.

Previo a los ensayos de RT-PCR, se llevó a cabo una comparación entre los RNAs extraídos de los diferentes grupos experimentales para verificar el rendimiento y calidad de la extracción y que no existan diferencias entre las distintas muestras. Asimismo se efectuó un análisis de pureza mediante la evaluación de la relación de densidad óptica (DO) 260/280 nm.

MUESTRA	RENDIMIENTO ($\mu\text{g RNA/mg tejido}$)	PUREZA DO 260/DO 280 nm
PN 6	1.3 ± 0.11	1.90 ± 0.05
PN 12	1.1 ± 0.13	1.82 ± 0.03
PN 20	1.2 ± 0.10	1.75 ± 0.05
PN 24	1.2 ± 0.15	1.79 ± 0.07
PN 28	1.4 ± 0.09	1.71 ± 0.07
PN 35	1.4 ± 0.16	1.98 ± 0.04
PN 40	1.3 ± 0.10	1.72 ± 0.04
PN 45	1.2 ± 0.12	1.78 ± 0.06
PN 60	1.1 ± 0.10	1.95 ± 0.02
PN 200	1.2 ± 0.11	1.74 ± 0.03

Tabla 3. Los valores corresponden al rendimiento y pureza de la extracción de RNA \pm desvío estándar del cuerpo estriado de los animales utilizados para la ontogenia. Cada valor de ontogenia corresponde al promedio de 3 estudios experimentales diferentes, $n = 8$ por ensayo. PN: día postnatal, DO: densidad óptica.

La Tabla 3 muestra niveles comparables de rendimiento y pureza en la extracción de RNA de los animales utilizados para realizar la ontogenia.

Tanto los animales entrenados como sus respectivos controles también muestran niveles comparables similares de rendimiento y pureza (Tabla 4). Los valores obtenidos que representan la pureza del RNA como también el rendimiento de la extracción, no son muy diferentes entre las muestras, tampoco entre los grupos experimentales.

	MUESTRA	RENDIMIENTO	PUREZA
		($\mu\text{g RNA/mg tejido}$)	DO 260/DO 280 nm
Entrenamiento PN 20-27	Cd	0.9 ± 0.14	1.85 ± 0.04
	Ed	1.1 ± 0.10	1.78 ± 0.06
	Ci	1.1 ± 0.20	1.92 ± 0.02
	Ei	1.2 ± 0.10	1.90 ± 0.04
	C	0.9 ± 0.17	1.77 ± 0.05
	E	1.2 ± 0.11	1.80 ± 0.05
Entrenamiento PN 30-37	Cd	0.9 ± 0.13	1.95 ± 0.07
	Ed	1 ± 0.14	1.72 ± 0.02
	Ci	0.8 ± 0.14	1.70 ± 0.06
	Ei	1 ± 0.10	1.84 ± 0.05
	C	1.1 ± 0.16	1.96 ± 0.05
	E	0.9 ± 0.12	1.73 ± 0.04
Entrenamiento PN 40-47	Cd	1.3 ± 0.20	1.82 ± 0.06
	Ed	1.3 ± 0.16	1.81 ± 0.04
	Ci	1.4 ± 0.13	1.93 ± 0.03
	Ei	1.3 ± 0.14	1.79 ± 0.05
	C	1.4 ± 0.15	1.75 ± 0.07
	E	1.4 ± 0.20	1.72 ± 0.03

Tabla 4. Los valores corresponden al rendimiento y pureza de la extracción de RNA \pm desvío estándar de los animales entrenados y sus controles. Cada valor de entrenamiento corresponde al promedio de 3 estudios experimentales, $n = 8$ animales entrenados y $n = 6$ animales control por estudio. Estos datos fueron obtenidos de animales sacrificados al PN 74. PN: día postnatal, DO: densidad óptica, Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

La calidad de la extracción fue evaluada mediante la corrida electroforética de las diferentes muestras en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó como parámetro la integridad de las bandas correspondientes al RNA ribosomal 28s y 18s y la ausencia de productos de degradación (Figura 6(ontogenia) y Figura 7 (entrenamiento)). También en estas figuras se puede observar en la zona inferior la tenue presencia de RNA de transferencia de

menor peso molecular (PM).

La Figura 6 corresponde a un gel representativo de la corrida electroforética de una extracción de RNA utilizado para la ontogenia. Se puede observar bastante uniformidad en la integridad del RNA de cada punto de la ontogenia.

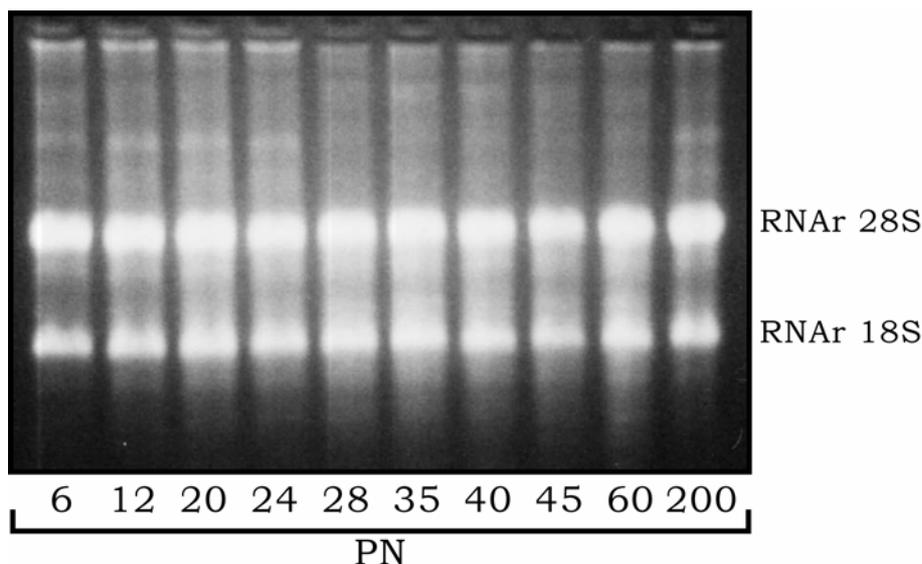


Figura 6. Electroforesis del RNA extraído de animales usados para la ontogenia. Gel representativo que muestra RNA ribosomal (RNAr) 28S (banda superior) y 18S (banda inferior) sin degradación. Cada calle corresponde a 4 μ g del RNA extraído del cuerpo estriado (hemiestriado) de animales de distintas edades para realizar la ontogenia. Hemiestriado derecho e izquierdo fueron procesados juntos. PN: día postnatal.

La Figura 7 corresponde a un gel representativo de la extracción de RNA de cuerpo estriado de animales controles y entrenados a distintas edades (PN 20, 30 y 40). Se puede apreciar un alto grado de paridad entre las diferentes muestras de un mismo grupo experimental como entre los distintos grupos experimentales.

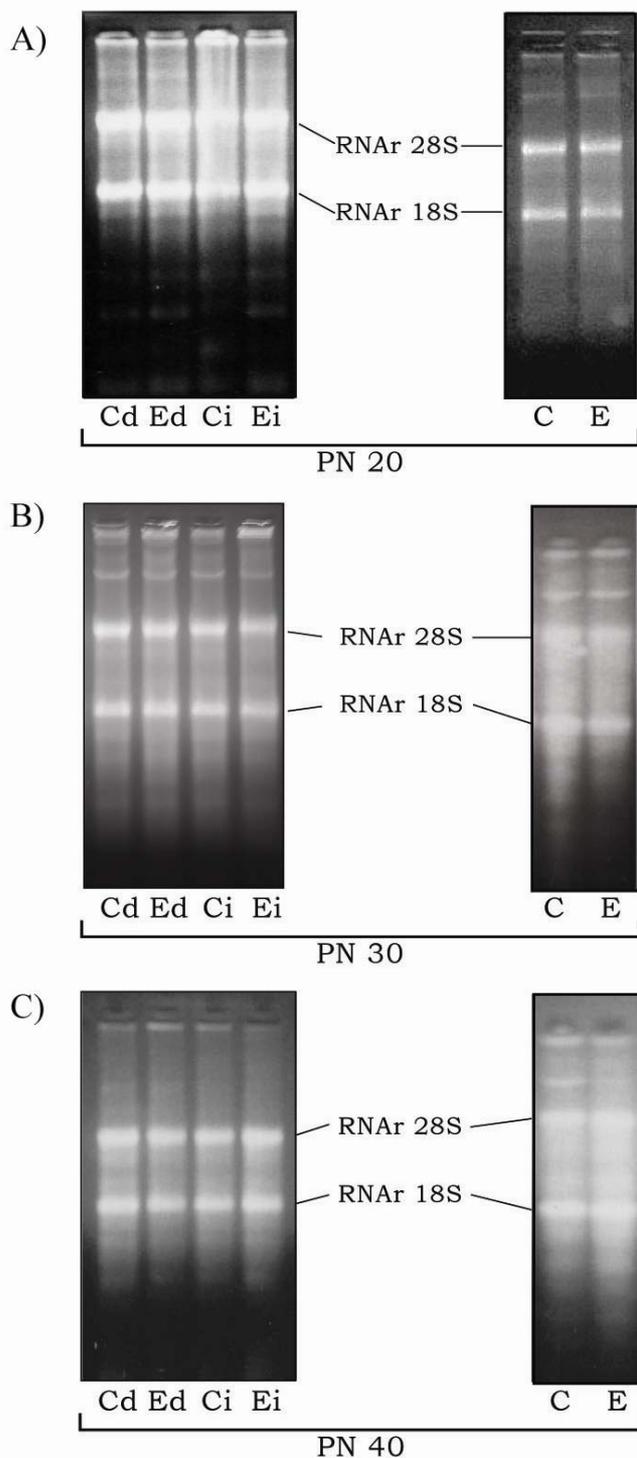


Figura 7. Electroforesis del RNA extraído de animales controles y entrenados a distintas edades.

*Gel representativo que muestra RNA ribosomal (RNAr) 28S (banda superior) y 18S (banda inferior) sin degradación. Cada calle corresponde a 4 μ g del RNA extraído del cuerpo estriado (hemiestriado) de animales controles y entrenados a distintas edades. **A)**, animales controles y entrenados al PN 20; **B)**, animales controles y entrenados al PN 30; **C)**, animales controles y entrenados al PN 40. En el caso de C y E ambos hemiestriados fueron procesados juntos. Todos los animales fueron sacrificados al PN 74.*

PN: día postnatal, Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

Con estos resultados en conjunto, se verificó que RNA de alta calidad fuese utilizado para producir cDNA.

3.2. ONTOGENIA DEL RECEPTOR NMDA EN CUERPO ESTRIADO

3.2.1. Medición de los receptores NMDA mediante ensayos de unión a ligando

Como ha sido indicado en la metodología, una parte del material disecado fue procesada para ser utilizada en ensayos de unión a ligando (binding) y la otra para realizar la extracción de RNA y luego RT-PCR.

En este apartado se compararon los niveles de unión del ligando específico [³H]MK-801 a la fracción de membrana sináptica de las muestras de distintas edades para la ontogenia. La Tabla 5 muestra el número de receptores NMDA ($B_{m\acute{a}x}$) obtenido mediante ensayos competitivos a saturación utilizando 80 nM de [³H]MK-801 y cantidades decrecientes del mismo (80-1 nM) para determinar la constante de disociación (afinidad, K_d).

Durante las tres primeras semanas del desarrollo postnatal se detectan valores similares de $B_{m\acute{a}x}$ produciéndose una marcada disminución del 50 % en el PN 24 ($p < 0.002$, PN 24 vs. PN 20; Tabla 5). Posteriormente, y de carácter notorio, en el PN 28 se observa un incremento cercano al 50 % ($p < 0.002$, PN 28 vs. PN 24), el cual es prácticamente mantenido al PN 35, recuperando así un valor similar al del PN 20. A partir del PN 40 se hace evidente un decremento gradual en los niveles del receptor hacia la adultez (PN 200). Alcanzando en esta edad, la máxima disminución del 37 % respecto al PN 35 ($p < 0.002$; Tabla 5).

Completando estos resultados, no se observan diferencias significativas en los valores de K_d entre las distintas edades de la ontogenia.

Binding del NMDAR con [³H]MK-801		
	$B_{\text{máx}}$ (pmol/mg prot.)	K_d (nM)
PN 6	6.6 ± 0.2	14.7 ± 1.5
PN 12	7.2 ± 0.3	11.9 ± 3.6
PN 20	6.8 ± 0.1	14.1 ± 3.3
PN 24	3.3 ± 0.2*	17.7 ± 1.1
PN 28	7.0 ± 0.5*	17.0 ± 1.4
PN 35	7.3 ± 0.4	13.1 ± 2.7
PN 40	6.0 ± 0.5#	12.4 ± 1.8
PN 45	5.1 ± 0.6*	16.4 ± 3.4
PN 60	5.0 ± 0.2*	14.8 ± 0.9
PN 200	4.6 ± 0.3*	16.7 ± 2.2

Tabla 5. Ontogenia del receptor NMDA mediante ensayos de unión a ligando en cuerpo estriado de rata. Los datos corresponden al número de receptores y afinidad en cuerpo estriado de ratas macho de la cepa Sprague-Dowley de diferentes edades. Los valores están presentados como el promedio ± desvío estándar de 3 ensayos por edad de 3 estudios experimentales diferentes, $n = 8$ por medición. * $p < 0.002$: PN 24 vs. PN 20, PN 28 vs. PN 24, PN 45-200 vs. PN 35; # $p < 0.05$ PN 40 vs. PN 35 (ANOVA, test de Tukey).

PN: día postnatal.

De esta manera, se evidencia una disminución puntual abrupta del número de receptores NMDA durante el desarrollo temprano del cuerpo estriado de rata sin modificación de la afinidad tanto durante el desarrollo como en la adultez.

3.2.2. Expresión de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo

Los niveles de receptores también pueden ser evaluados analizando la expresión del RNAm de sus subunidades. En este contexto, se estudió la expresión del RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B a partir de la obtención de DNA copia (cDNA), mediante transcripción reversa, y luego amplificación por PCR (RT-PCR) de manera semicuantitativa.

Se evaluó un total de 24 animales por edad correspondientes a 3 estudios experimentales diferentes.

3.2.2.1. Puesta a punto y elección de ciclos de amplificación

Para la puesta a punto de los diferentes parámetros de la técnica se utilizó un cDNA obtenido a partir de RNA total extraído de ratas macho Sprague-Dowley de 60 días de edad.

Una vez seleccionadas las concentraciones óptimas de Mg^{++} y las temperaturas de annealing para cada subunidad y para el gen de expresión constitutiva, se procedió a realizar curvas de amplificación con distinto número de ciclos (Figura 8). Estas curvas fueron necesarias para determinar la zona de linealidad de la amplificación y, posteriormente, asegurar que no se esté realizando la amplificación en un punto de saturación para poder comparar relativamente los productos amplificados entre sí. De esta manera es posible determinar la existencia de diferencias entre las distintas muestras mediante el análisis semicuantitativo del producto amplificado.

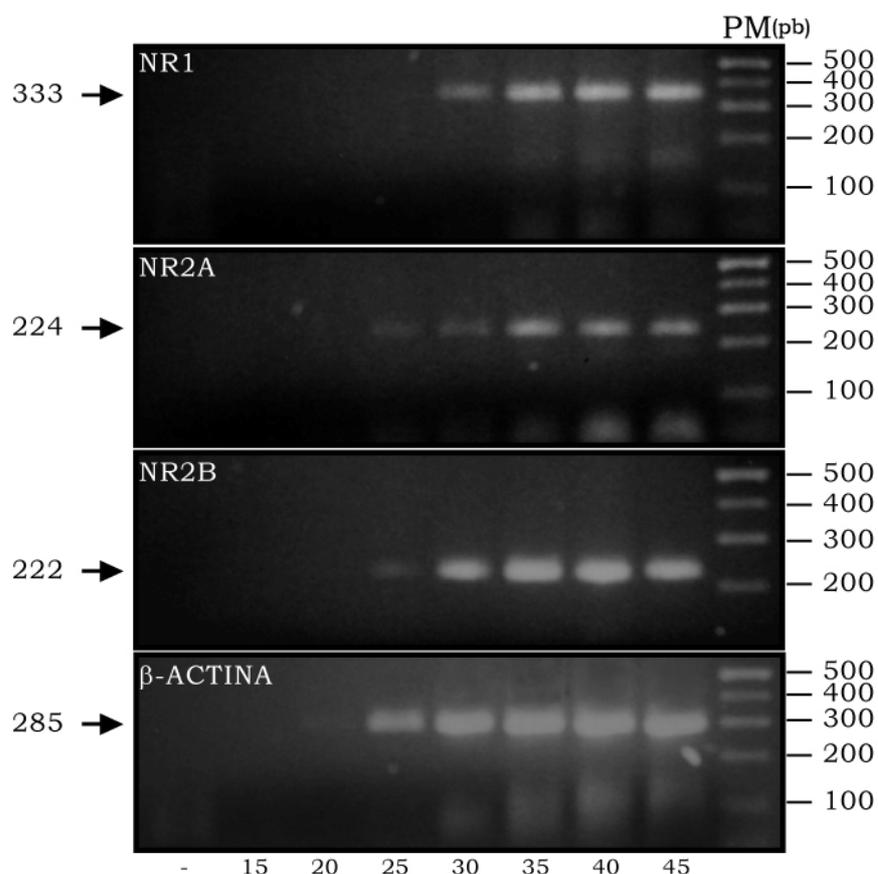


Figura 8: Curvas de ciclos de amplificación de NR1, NR2A, NR2B y β -Actina. cDNA control de cuerpo estriado de rata fue amplificado por PCR con 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 ciclos para cada subunidad del NMDAR y β -Actina. Las bandas correspondientes a los productos de PCR muestran un peso molecular acorde a lo esperado, 333 pb (NR1), 224 pb (NR2A), 222 pb (NR2B) y 285 pb (β -Actina). (-): controles negativos en los cuales el cDNA fue reemplazado por agua. PM: son marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. pb: pares de bases.

Otro punto importante a tener en cuenta a partir de estas amplificaciones es la presencia de una única banda y del tamaño esperado, según datos de referencia, de 333, 224, 222 y 285 pb para NR1, NR2A, NR2B y β -Actina respectivamente. Las bandas de bajo PM observadas en algunos casos corresponden a la presencia de primers no consumidos en la reacción, tanto en forma simple como posiblemente en forma de dímeros.

Los productos de amplificación fueron semicuantificados mediante el análisis de la intensidad de cada banda (Tabla 6). Los valores obtenidos fueron graficados y a partir de este gráfico se determinó la zona lineal de amplificación para cada subunidad y se eligió el número de ciclos adecuado que permitiese una correcta semicuantificación.

	Unidades arbitrarias de medida de intensidad						
	15 ciclos	20 ciclos	25 ciclos	30 ciclos	35 ciclos	40 ciclos	45 ciclos
NR1	50	50	50	250	500	550	649
NR2A	50	100	150	225	338	348	355
NR2B	50	50	125	600	702	793	849
β -Actina	50	600	1002	1102	1152	1302	1302

Tabla 6: Análisis de la densidad de banda en muestras de cDNA control. La tabla muestra los valores relativos obtenidos de cada banda para cada subtipo de receptor y para β -Actina a partir de una medición representativa. Los datos corresponden a amplificaciones (PCR) con distinto número de ciclos, registrados como intensidad de banda en unidades arbitrarias de medida de intensidad.

La Figura 9 muestra el gráfico efectuado con los valores de la Tabla 6. A partir de este gráfico se decidió trabajar con 27 ciclos de amplificación para las subunidades NR1, NR2A y NR2B y con 20 ciclos para β -Actina.

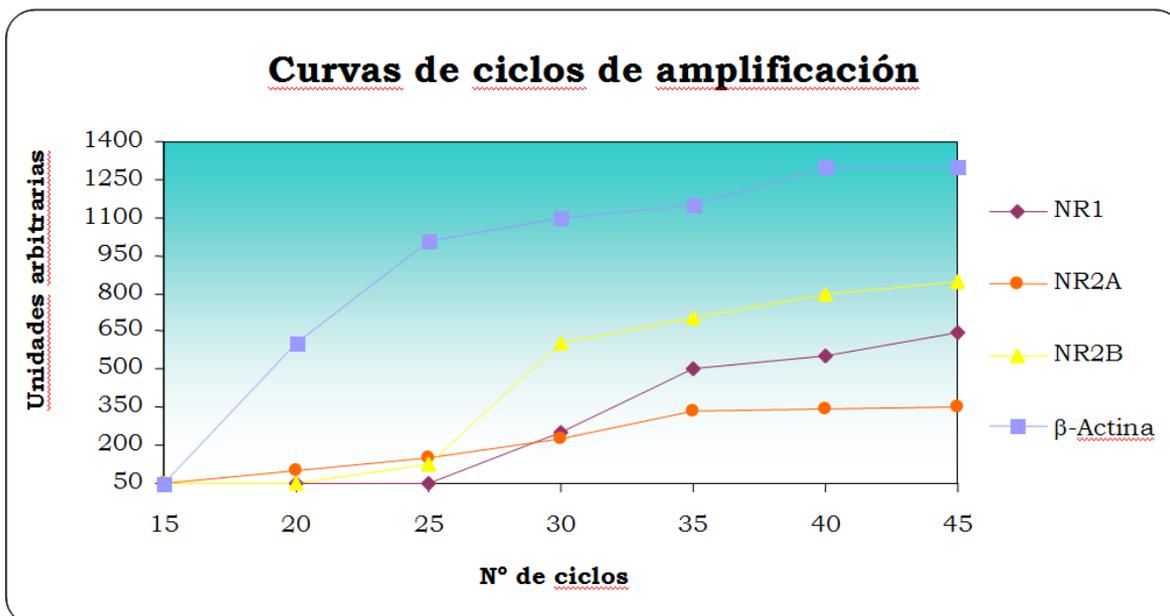


Figura 9: Gráfico de los datos obtenidos a partir de la semicuantificación de las curvas de ciclos. El gráfico muestra las regiones de linealidad y efecto plateau de la amplificación por PCR para las subunidades del receptor NMDA y β -Actina. Los valores en unidades arbitrarias de medida de intensidad son los registrados en la Tabla 6.

3.2.2.2. Expresión del RNAm de NR1, NR2A y NR2B

Una vez seleccionados los ciclos de amplificación para cada subunidad del NMDAR a ser evaluada se procedió a realizar la PCR a partir del cDNA obtenido de cada PN. Las Figuras 10-12 muestran los niveles de expresión del RNAm de las subunidades del receptor NMDA durante el desarrollo en cuerpo estriado de rata. Cada valor obtenido de la semicuantificación de cada subunidad ha sido normalizado con los valores de semicuantificación de los niveles de expresión del RNAm de β -Actina.

Durante el desarrollo postnatal la expresión del RNAm de NR1 muestra un leve incremento hasta el PN 20 ($p < 0.0002$, PN 12 vs. PN 6; $p < 0.001$, PN 20 vs. PN 6) y una marcada disminución al PN 24 del 64 % ($p < 0.0002$, PN 24 vs. PN 20). Posteriormente, esta disminución se reestablece en el PN 28 a un valor similar al PN 20 ($p < 0.0002$, PN 28 vs. PN 24), luego los niveles de expresión del RNAm de la subunidad NR1 van disminuyendo hasta alcanzar valores moderados en el adulto (Figura 10A y B).

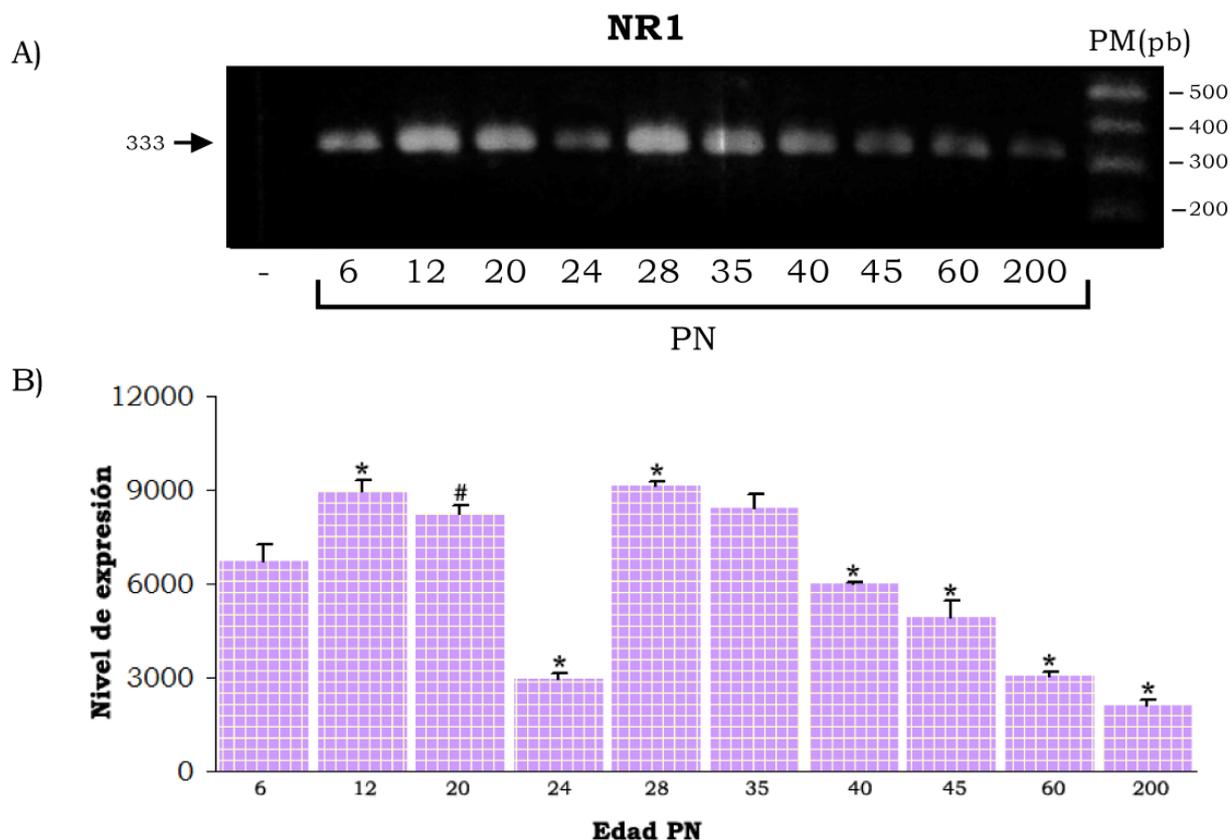


Figura 10. Ontogenia de la subunidad NR1 en cuerpo estriado de rata: expresión del RNAm mediante RT-PCR. A), las bandas de aproximadamente 333 pb corresponden a productos de RT-PCR de la subunidad NR1. (-): control negativo en el cual el cDNA fue omitido y reemplazado por igual volumen de agua. PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. pb: pares de bases.

B), los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del RNAm de la subunidad NR1 luego de la RT-PCR normalizado con los niveles de expresión del RNAm de β -Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes, $n = 8$ por edad. * $p < 0.0002$: PN 12 vs. PN 6, PN 24 vs. PN 20, PN 28 vs. PN 24, PN 40-200 vs. PN 35; # $p < 0.001$ PN 20 vs. PN 6 (ANOVA, test de Tukey). PN: día postnatal.

De manera similar, la expresión del RNAm de NR2A muestra un leve pero significativo incremento desde el PN 6 y hasta el PN 24 ($p < 0.001$, PN 12 vs. PN 6; $p < 0.0004$, PN 20 vs. PN 6; $p < 0.002$, PN 24 vs. PN 6; Figura 6A y B). Los niveles de expresión disminuyeron significativamente un 26 % en el PN 28 ($p < 0.0002$, PN 28 vs. PN 24), pero a la siguiente edad postnatal ensayada esta disminución es revertida observándose un valor similar al PN 20 ($p < 0.0002$, PN 35 vs. PN 28). A partir del PN 35 la expresión del RNAm de NR2A va disminuyendo hasta alcanzar niveles casi indetectables al PN 200 ($p < 0.0002$, PN 45, 60 y 200 vs. PN 35), Figura 11.

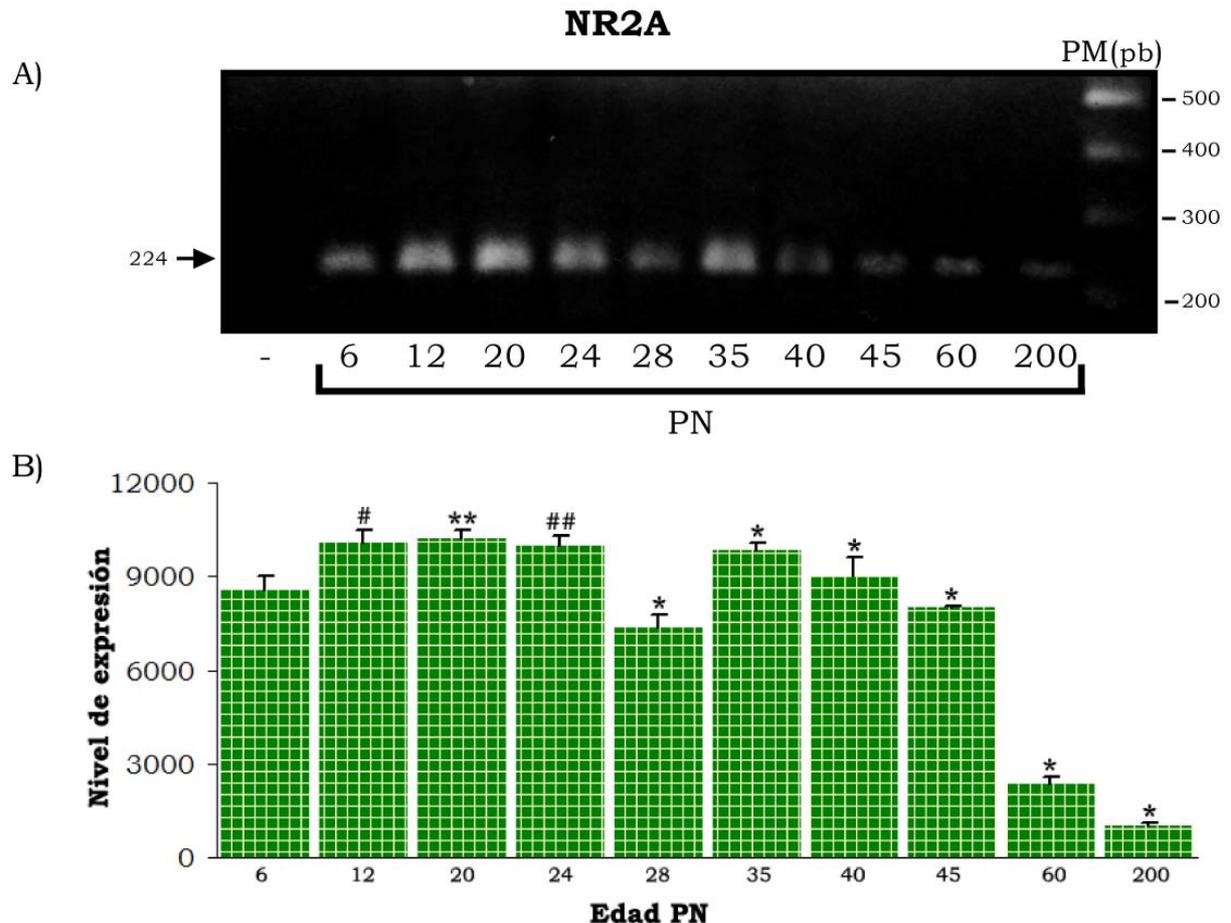


Figura 11. Ontogenia de la subunidad NR2A en cuerpo estriado de rata: expresión del RNAm mediante RT-PCR. A) las bandas de aproximadamente 224 pb corresponden a productos de RT-PCR de la subunidad NR2A. (-): control negativo en el cual el cDNA fue omitido y reemplazado por igual volumen de agua. PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. pb: pares de bases.

B) los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del RNAm de la subunidad NR2A luego de la RT-PCR normalizado con los niveles de expresión del RNAm de β -Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes, $n = 8$ por edad. # $p < 0.001$: PN 12 vs. PN 6; ** $p < 0.0004$, PN 20 vs. PN 6; ## $p < 0.002$: PN 24 vs. PN 6; * $p < 0.0002$: PN 28 vs. PN 24, PN 35 vs. PN 28, PN 40-200 vs. PN 35 (ANOVA, test de Tukey). PN: día postnatal.

En comparación con las otras subunidades estudiadas del receptor NMDA, el nivel de expresión del RNAm de la subunidad NR2B fue el más bajo al PN 6 y se mantuvo prácticamente sin cambios hasta el PN 24. No obstante, al PN 28 se observa una reducción del 50 % ($p < 0.0002$, PN 28 vs. PN 24) en la expresión del RNAm, Figura 12A y B.

En este caso, a diferencia de NR1 y NR2A, la recuperación del nivel de expresión del RNAm luego de la disminución observada ocurre de manera gradual. Un pequeño pero significativo incremento se observa al PN 35 ($p <$

0.005, PN 35 vs. PN 28), este aumento continúa hasta el PN 45, obteniéndose valores similares al PN 24 recién al PN 40. Los valores ya declinan al PN 60 y son muy bajos en los animales adultos ($p < 0.0002$, PN 60 y 200 vs. PN 45; Figura 12).

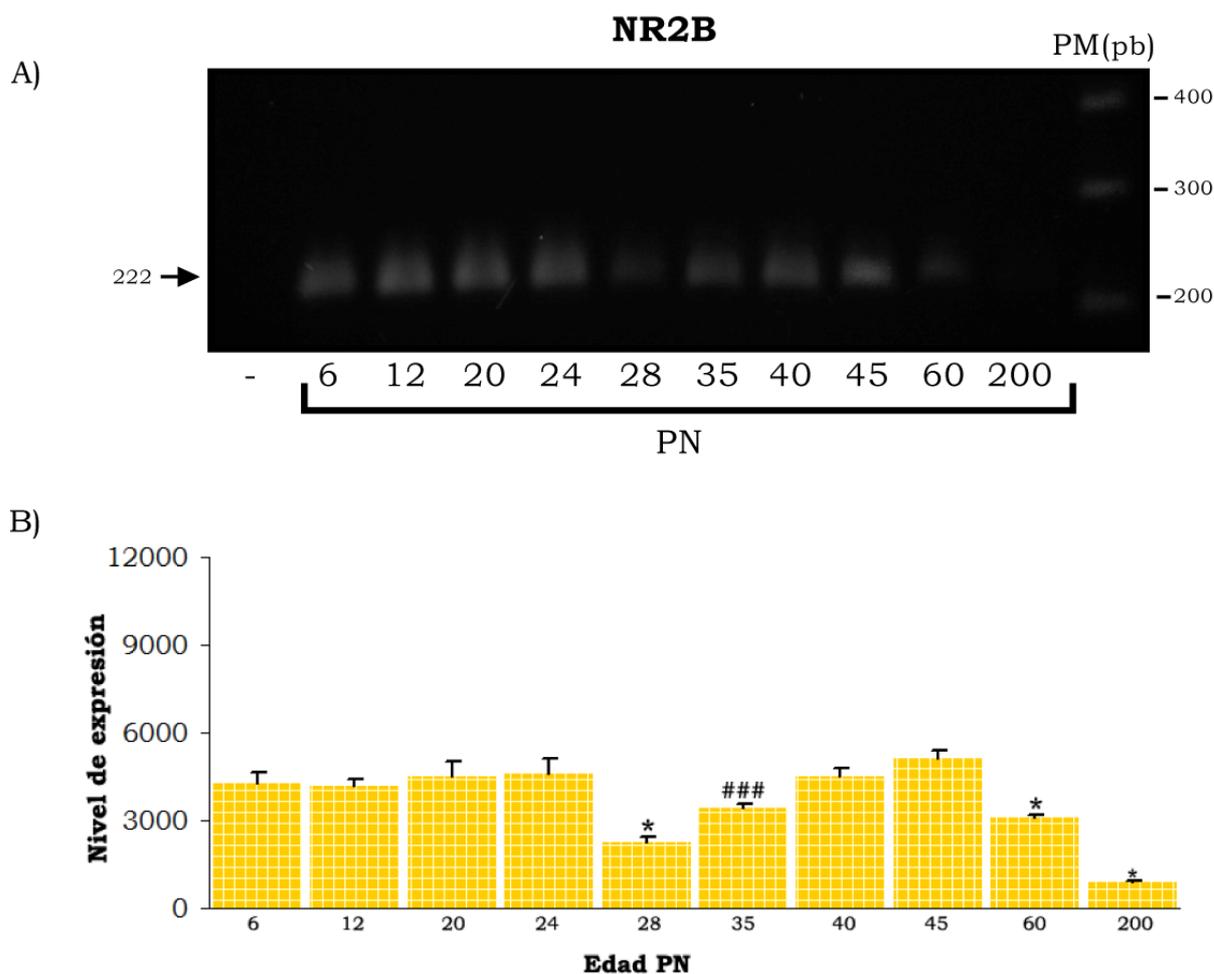


Figura 12. Ontogenia de la subunidad NR2B en cuerpo estriado de rata: expresión del RNAm mediante RT-PCR. A), las bandas de aproximadamente 222 pb corresponden a productos de RT-PCR de la subunidad NR2B. (-): control negativo en el cual el cDNA fue omitido y reemplazado por igual volumen de agua. PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. pb: pares de bases.

B), los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del RNAm de la subunidad NR2B luego de la RT-PCR normalizado con los niveles de expresión del RNAm de β -Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes, $n = 8$ por edad. * $p < 0.0002$: PN 28 vs. PN 24, PN 60 vs. PN 45, PN 200 vs. PN 45; ### $p < 0.005$ PN 35 vs. PN 28 (ANOVA, test de Tukey). PN: día postnatal.

3.3. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO A DISTINTAS EDADES EN EL RECEPTOR NMDA

3.3.1. Efectos del test de entrenamiento circular (TEC): reducción del número de receptores NMDA

Para evaluar los efectos del entrenamiento, ratas macho de la cepa Sprague-Dowley realizaron el TEC a distintas edades. Los animales comenzaron el entrenamiento al día postnatal 20, 30 o 40 (PN 20, 30 o 40) y lo continuaron por 7 días. Descontándose la S0 que se realizó en todos los casos, los 3 grupos experimentales acumularon un total de aproximadamente 900 vueltas (900 metros recorridos). Luego del entrenamiento los animales fueron sacrificados al PN 74 y, como se explicó anteriormente, cada hemiestriado fue disecado y procesado tanto para las mediciones con ligando radiactivo como para las RT-PCRs. Las determinaciones neuroquímicas fueron realizadas sobre la fracción de membrana sináptica 1 M. Debido a la carencia de información acerca de posibles efectos del sentido de giro de los animales en el TEC sobre los receptores NMDA, las mediciones fueron realizadas tanto sobre muestras correspondientes a hemiestriado derecho e izquierdo por separado, como procesados juntos.

La Tabla 7 muestra los valores de $B_{m\acute{a}x}$ del receptor NMDA obtenidos mediante ensayos competitivos a saturación utilizando 80 nM del ligando específico [3 H]MK-801 en los grupos de animales entrenados a distintas edades.

El análisis estadístico de estos resultados experimentales permite comprobar que sólo los animales entrenados a partir del PN 20 evidencian una disminución significativa de aproximadamente el 40 % ($p < 0.002$) en el número de receptores NMDA, mientras que el resto de los grupos experimentales no presentan diferencias con su control respectivo. Además, se verifica que esta disminución es bilateral y de magnitud simétrica.

		Binding del NMDAR con [³H]MK-801					
		Cd	Ed	Ci	Ei	C	E
PN 20-27	$B_{\text{máx}}$ (pmol/mg prot.)	4.9 ± 0.2	2.8 ± 0.4*	5.0 ± 0.3	3.0 ± 0.2*	5.2 ± 0.6	3.1 ± 0.1*
	K_d (nM)	13.2 ± 0.5	14.7 ± 0.2	14.9 ± 0.3	15.3 ± 0.6	13.6 ± 0.1	12.3 ± 0.4
PN 30-37	$B_{\text{máx}}$ (pmol/mg prot.)	5.1 ± 0.3	4.9 ± 0.5	4.6 ± 0.6	4.8 ± 0.4	4.5 ± 0.2	5.0 ± 0.1
PN 40-47	$B_{\text{máx}}$ (pmol/mg prot.)	5.5 ± 0.2	5.3 ± 0.4	4.9 ± 0.3	4.6 ± 0.1	5.2 ± 0.5	4.8 ± 0.6

Tabla 7. Efecto del TEC en el número de receptores NMDA mediante ensayos de unión a ligando en cuerpo estriado de rata. Los datos corresponden al número de receptores y afinidad de muestras de animales entrenados a distintas edades. Los valores están expresados como el promedio ± desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes por edad, $n = 8$ por medición. * $p < 0.002$ (ANOVA, test de Tukey).

PN: día postnatal, Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

Las curvas de Scatchard realizadas con cantidades decrecientes (80-1 nM) del ligando [³H]MK-801 en muestras de animales entrenados al PN 20 no muestran diferencias en la afinidad, K_d (Tabla 7).

3.3.2. Efectos del test de entrenamiento circular (TEC): disminución de la expresión de las subunidades del receptor NMDA

Para realizar este conjunto de experimentos y evaluar los efectos del entrenamiento sobre la expresión de las subunidades del NMDAR, se utilizó el hemiestriado remanente de los grupos de animales que realizaron el entrenamiento comenzando el día postnatal 20, 30 o 40 (PN 20, 30 o 40) y durante 7 días, acumulando un total de 900 vueltas. A partir del cDNA obtenido de cada muestra se realizó PCR con primers específicos para las subunidades NR1, NR2A y NR2B; y β -Actina (gen de expresión constitutiva).

Las Figuras 13-15 muestran los niveles de expresión del RNAm de las subunidades del NMDAR en animales controles y entrenados. Los datos corresponden a mediciones realizadas en muestras de estriado derecho e izquierdo procesados por separado y juntos.

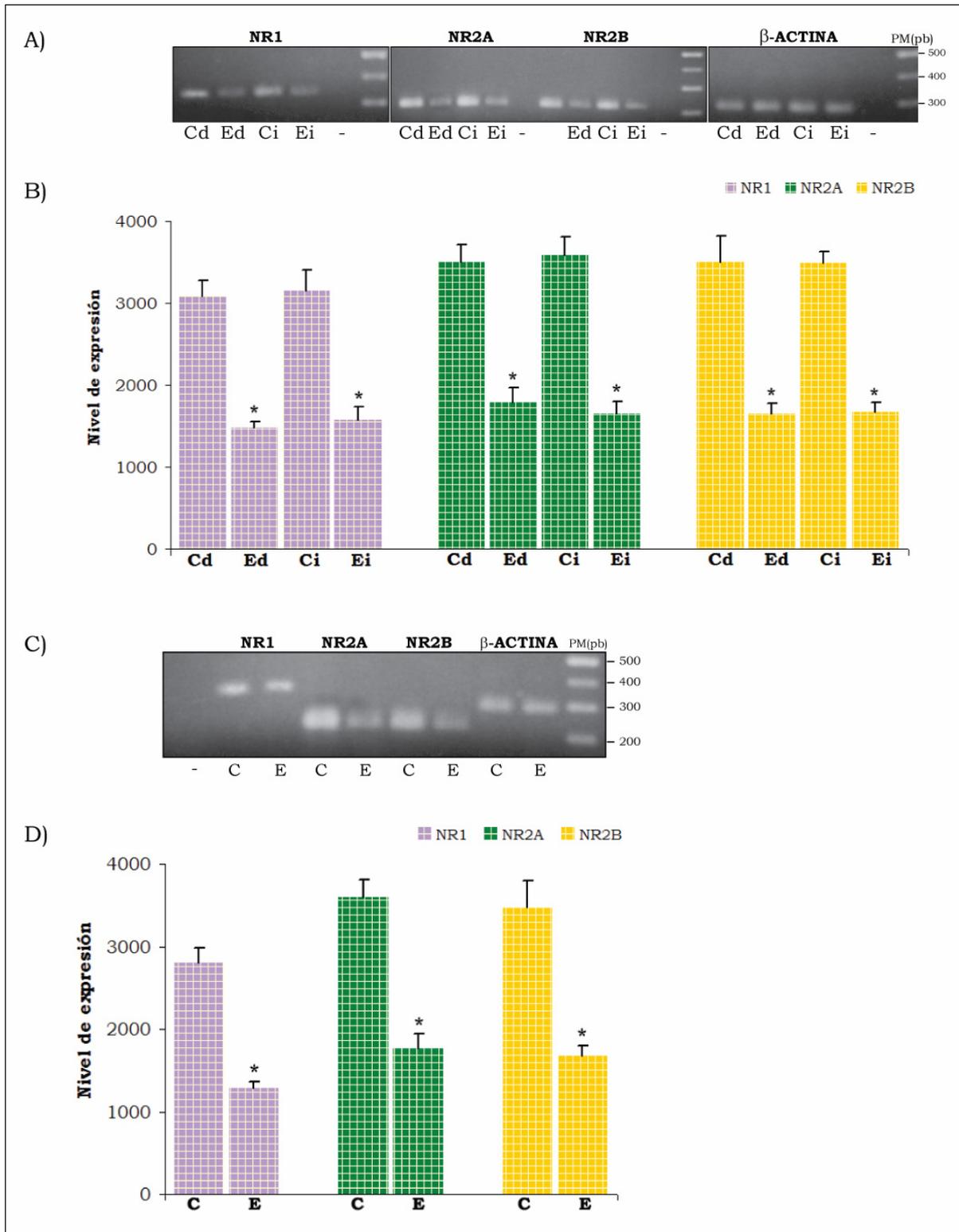


Figura 13. Expresión del RNAm de las subunidades del NMDAR en animales entrenados a los 20 días postnatales.

A y C), las bandas de aproximadamente 333, 224, 222 y 285 pb corresponden a productos de RT-PCR de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, y β -Actina respectivamente. (-): control negativo en el cual el cDNA fue omitido y reemplazado por igual volumen de agua. PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. pb: pares de bases.

B y D), los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B luego de la RT-PCR normalizado con los niveles de expresión del RNAm de β -Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes por edad, $n = 8$ por medición. * $p < 0.001$: Ed vs. Cd, Ei vs. Ci, E vs. C (ANOVA, test de Tukey).

Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

Cada valor obtenido de la semicuantificación del producto de PCR de cada subunidad (en unidades arbitrarias) ha sido normalizado con los valores de semicuantificación de los niveles de expresión del RNAm de β -Actina (Figuras 13, 14 y 15; B y D)

A partir del análisis semicuantitativo de la intensidad óptica de los niveles de expresión, se evidencia una disminución cercana al 50 % en los niveles de expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B en los animales entrenados al PN 20 (Figura 13), sin cambios en la expresión del RNAm de β -Actina. También se verifica en esta figura que la disminución es bilateral y de magnitud simétrica en ambos estriados (derecho e izquierdo). Este resultado es consistente con los datos obtenidos a nivel de la proteína en los ensayos de unión a ligando específico (Tabla 7).

Se verifica asimismo, que los demás grupos experimentales (animales entrenados a los 30 y 40 días postnatales) no presentan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del RNAm con sus controles respectivos (Figuras 14 y 15). Pudiéndose también correlacionar este resultado con lo observado en los ensayos de binding (Tabla 7).

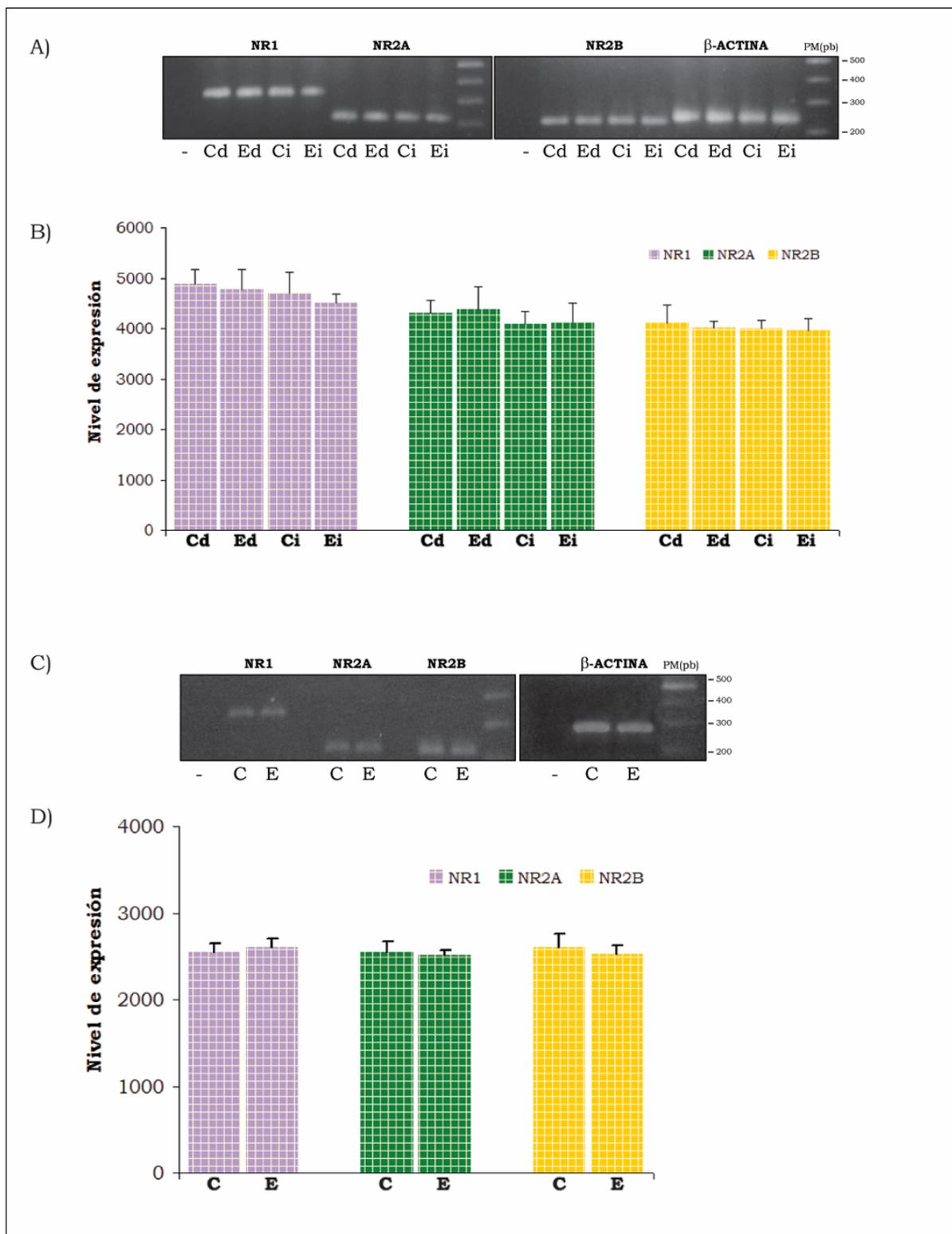


Figura 14. Expresión del RNAm de las subunidades del NMDAR en animales entrenados a los 30 días postnatales.

A y C) las bandas de aproximadamente 333, 224, 222 y 285 pb corresponden a productos de RT-PCR de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, y β -Actina respectivamente. (-): control negativo en el cual el cDNA fue omitido y reemplazado por igual volumen de agua. PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. pb: pares de bases.

B y D) los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B luego de la RT-PCR normalizado con los niveles de expresión del RNAm de β -Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes por edad, $n = 8$ por medición. * $p > 0.1$: Ed vs. Cd, Ei vs. Ci, E vs. C (ANOVA, test de Tukey).

Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

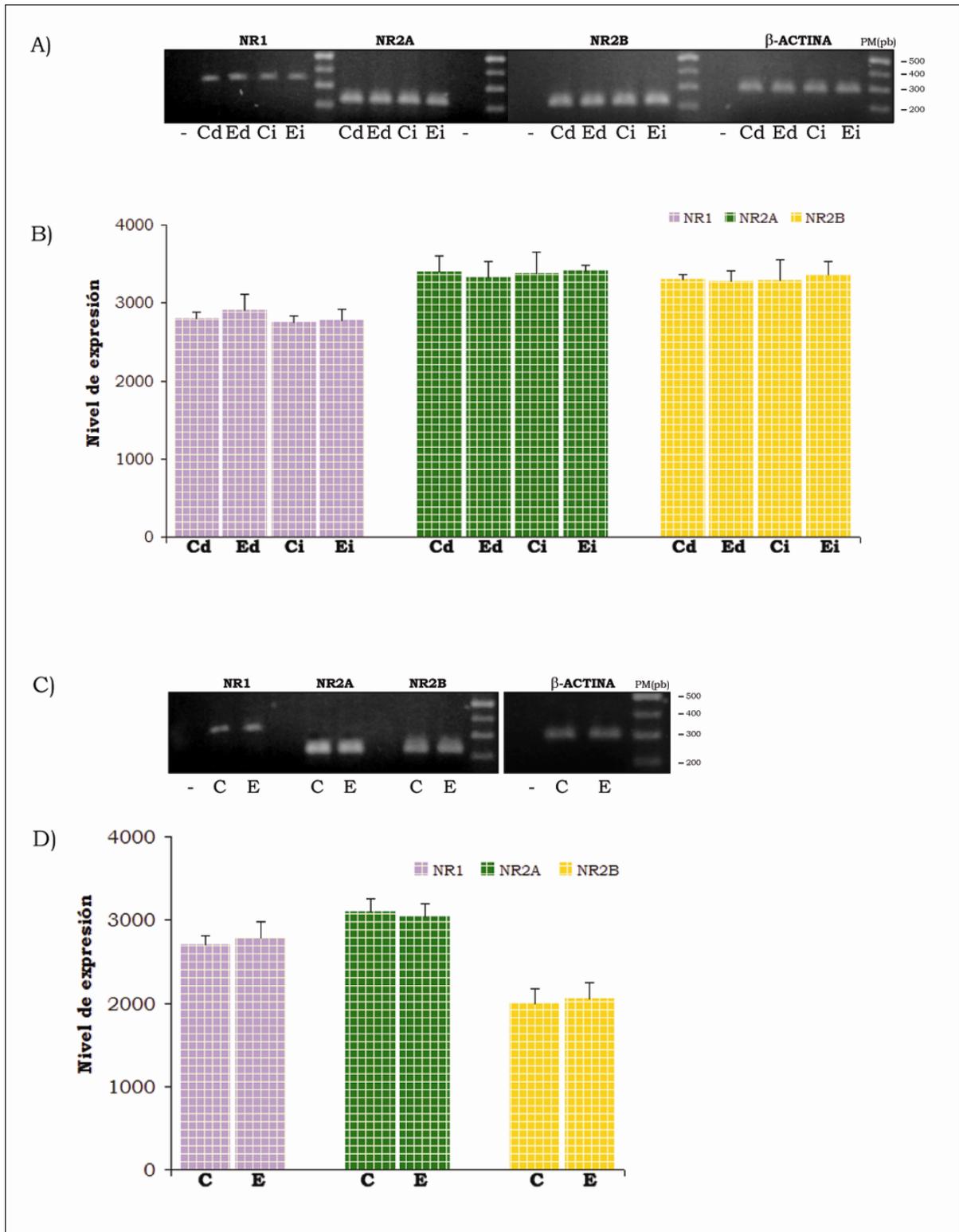


Figura 15. Expresión del RNAm de las subunidades del NMDAR en animales entrenados a los 40 días postnatales. **A y C)**, las bandas de aproximadamente 333, 224, 222 y 285 pb corresponden a productos de RT-PCR de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, y β -Actina respectivamente. (-): control negativo en el cual el cDNA fue omitido y reemplazado por igual volumen de agua. PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. pb: pares de bases. **B y D)**, los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B luego de la RT-PCR normalizado con los niveles de expresión del RNAm de β -Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes por edad, $n = 8$ por medición. * $p > 0.1$: Ed vs. Cd, Ei vs. Ci, E vs. C (ANOVA, test de Tukey). Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

3.4. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE PROTEÍNAS PRE Y POSTSINÁPTICAS

3.4.1. Disminución de la expresión de PSD-95 en animales entrenados a los 20 días de edad

Mediante ensayos de Western blot se estudió la expresión de la proteína presináptica Sinaptofisina (proteína de vesícula sináptica) y de la proteína postsináptica PSD-95. Estas determinaciones fueron realizadas utilizando la fracción de membrana sináptica 1M obtenida para realizar los ensayos de binding del receptor NMDA.

El patrón de expresión de la proteína PSD-95 en los animales entrenados a los 20 días reveló un patrón similar a lo observado tanto en los niveles de receptores NMDA como en la expresión de sus subunidades. En la Figura 16 se puede evaluar una reducción de los niveles de expresión de PSD-95 en animales entrenados. El análisis semicuantitativo de la densidad de la banda correspondiente a la proteína (normalizado a Actina) demuestra una reducción de aproximadamente 45 % ($p < 0.002$, Figura 16). De igual modo se verifica que esta reducción ocurre de manera simétrica tanto en muestras provenientes del estriado derecho como izquierdo.

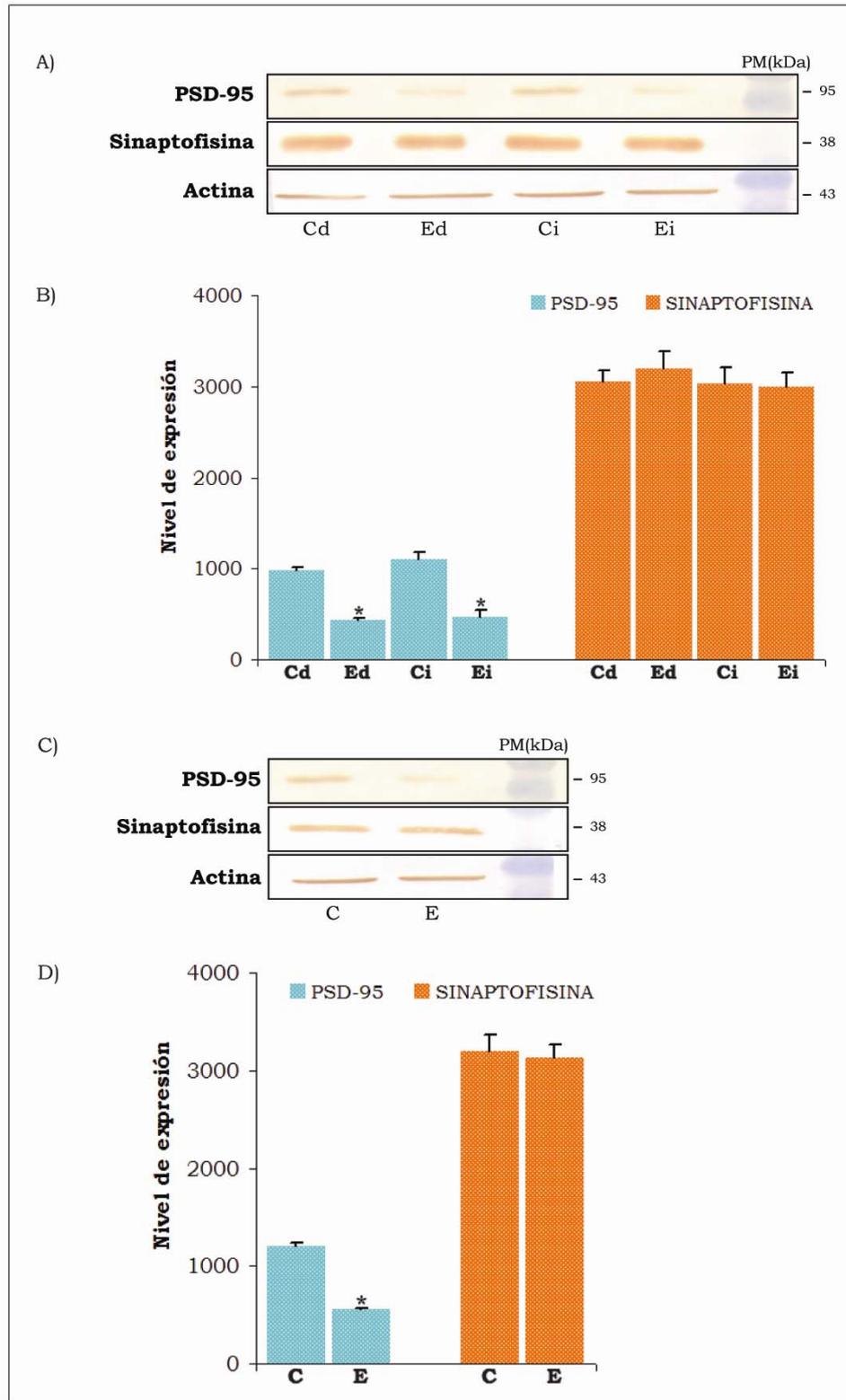


Figura 16. Western blot de PSD-95 y Sinaptofisina en estradiol de animales entrenados a los 20 días postnatales.

A y C), cada anticuerpo marcó una única banda específica del peso molecular esperado (PSD-95: 95 kDa, Sinaptofisina: 38 kDa, Actina: 43 kDa). . PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. kDa: kiloDaltons.

B y D), los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión de las proteínas PSD-95 y Sinaptofisina normalizados con los niveles de expresión de Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes por edad, $n = 8$ por medición. * $p < 0.002$: Ed vs. Cd, Ei vs. Ci, E vs. C (ANOVA, test de Tukey).

PN: día postnatal, Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

Como ha sido expuesto en la Introducción, PSD-95 es una proteína que se une de manera directa al receptor NMDA y una reducción de sus niveles en el estriado podría reflejar una pérdida de sinapsis glutamatérgicas en esta región. Para evaluar esta posibilidad también se analizó el nivel de expresión de Sinaptofisina como marcador presináptico.

El resultado observado para PSD-95 no se correlaciona con la expresión de la proteína Sinaptofisina en los animales entrenados durante PN 20-27. En la misma figura se puede apreciar que los niveles de expresión de la proteína presináptica, en animales entrenados, permanecen inalterados (Figura 16).

Al realizar este mismo estudio en muestras de animales entrenados a los 30 y 40 días de edad, se comprueba la ausencia de efecto del entrenamiento en los niveles de estas proteínas estudiadas (Figuras 17 y 18).

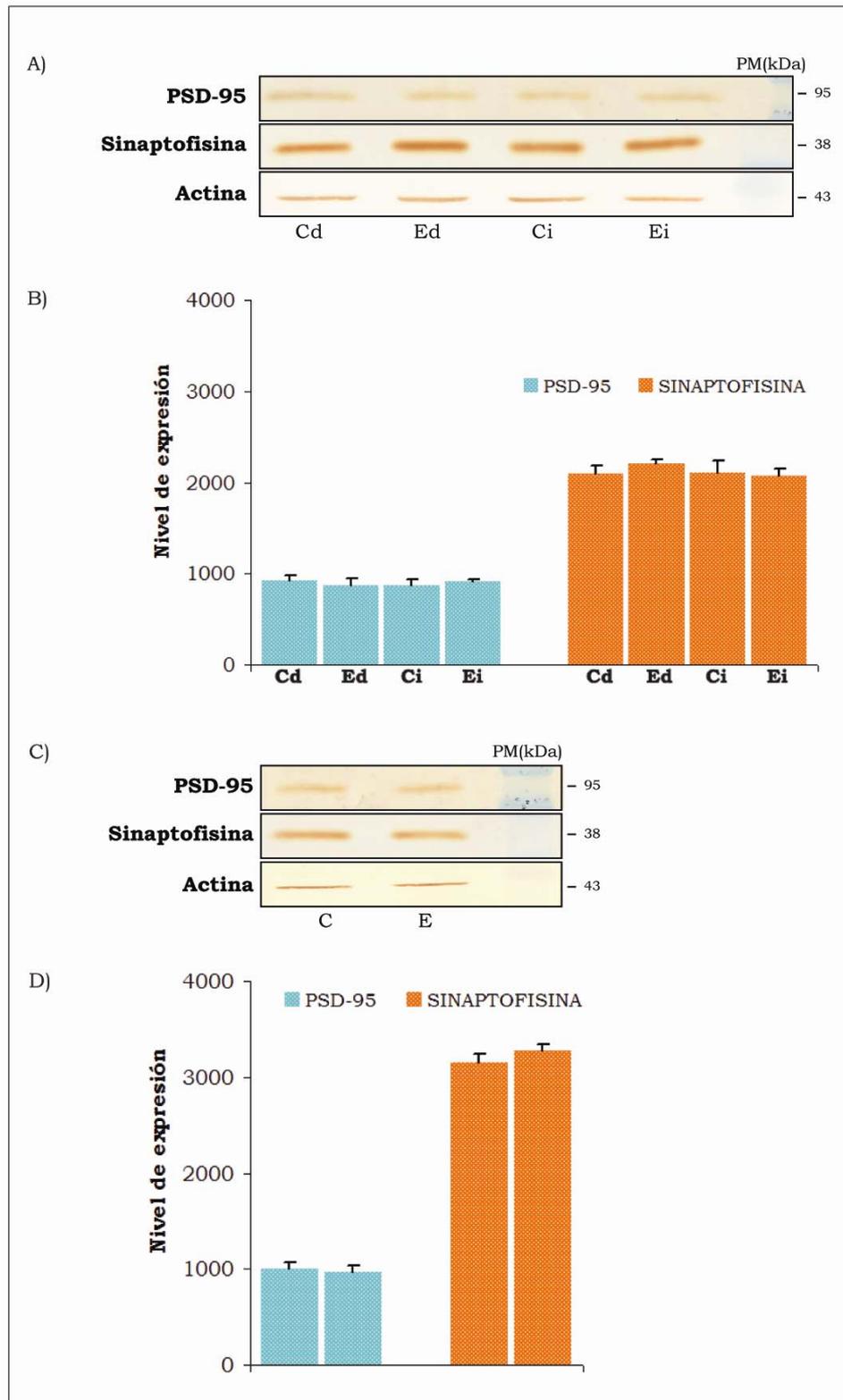


Figura 17. Western blot de PSD-95 y Sinaptofisina en estriado de animales entrenados a los 30 días postnatales.

A y C), cada anticuerpo marcó una única banda específica del peso molecular esperado (PSD-95: 95 kDa, Sinaptofisina: 38 kDa, Actina: 43 kDa). . PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. kDa: kiloDaltons.

B y D), los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión de las proteínas PSD-95 y Sinaptofisina normalizados con los niveles de expresión de Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes por edad, $n = 8$ por medición. * $p > 0.1$: Ed vs. Cd, Ei vs. Ci, E vs. C (ANOVA, test de Tukey).

PN: día postnatal, Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

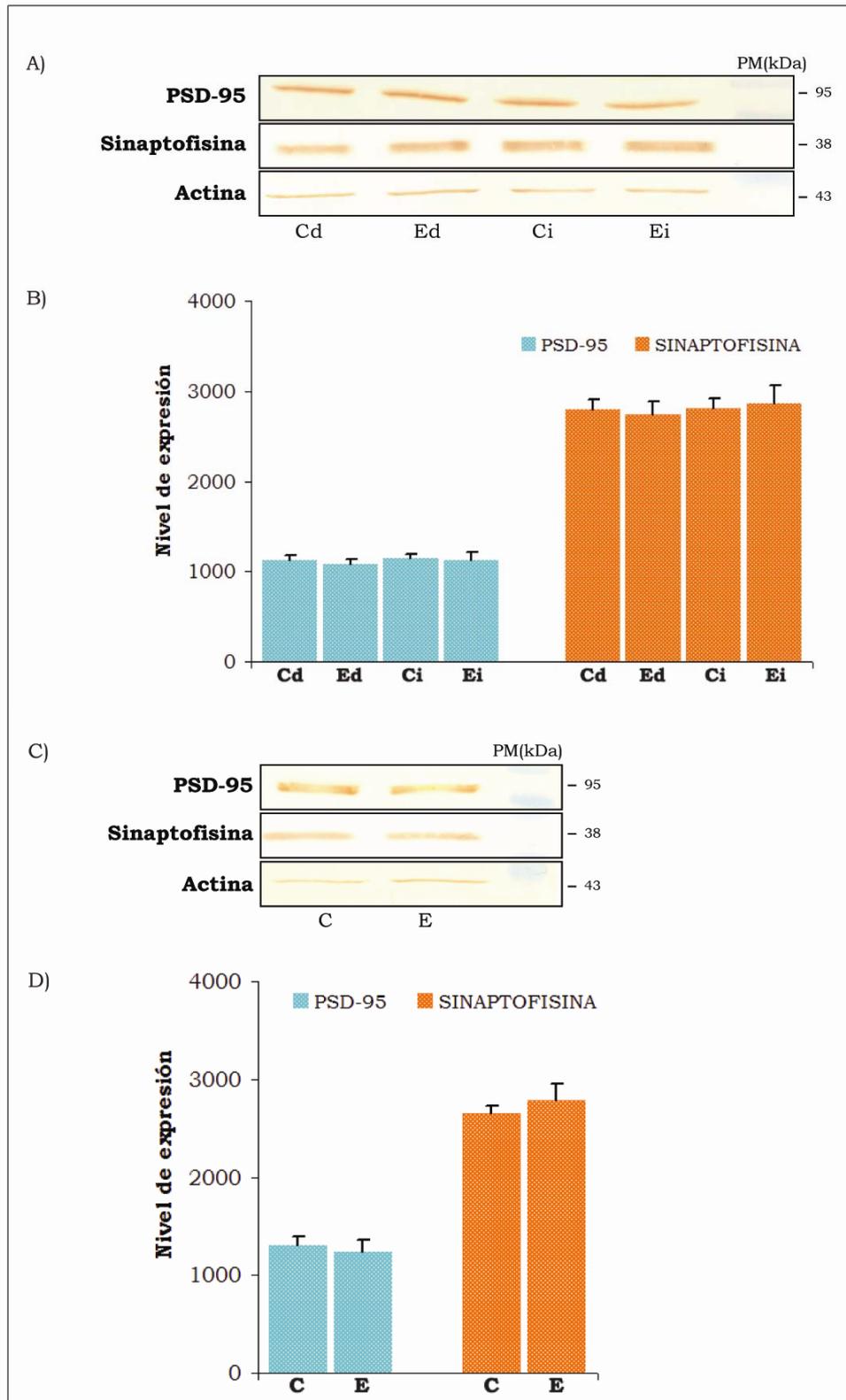


Figura 17. Western blot de PSD-95 y Sinaptofisina en estriado de animales entrenados a los 40 días postnatales.

A y C), cada anticuerpo marcó una única banda específica del peso molecular esperado (PSD-95: 95 kDa, Sinaptofisina: 38 kDa, Actina: 43 kDa). . PM: marcadores de peso molecular utilizados para identificar los productos. kDa: kiloDaltons.

B y D), los gráficos muestran el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión de las proteínas PSD-95 y Sinaptofisina normalizados con los niveles de expresión de Actina. Las barras representan la intensidad relativa promedio de cada banda \pm desvío estándar de 3 estudios experimentales diferentes por edad, $n = 8$ por medición. * $p > 0.1$: Ed vs. Cd, Ei vs. Ci, E vs. C (ANOVA, test de Tukey).

PN: día postnatal, Cd/Ci: control derecho e izquierdo, Ed/Ei: entrenado derecho e izquierdo, C: control derecho + izquierdo, E: entrenado derecho + izquierdo.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1. ONTOGENIA DEL RECEPTOR NMDA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL CUERPO ESTRIADO

Los resultados del presente trabajo proveen información comparativa del patrón de expresión del receptor NMDA en cuerpo estriado de rata durante el desarrollo. Este estudio ha sido realizado tanto a nivel de la proteína como del RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B. Este es el primer trabajo que describe, de manera completa, el patrón de expresión del receptor NMDA durante el desarrollo postnatal del cuerpo estriado de rata abarcando el período crítico de plasticidad dependiente de actividad. En estudios previos se ha demostrado la existencia de dicho período crítico de plasticidad dependiente de actividad en el cual la actividad motora fisiológica realizada en el TEC durante los días PN 30-37 produce cambios plásticos permanentes en el sistema colinérgico-dopaminérgico (Ibarra y col. 1995, 1996; Soiza-Reilly y col. 2004) y transitorios (Paratcha y col. 1998, 1999; Azcurra y col. 2003). También se ha verificado que la manifestación temporal de este período puede ser modificada por la neurotrofina NGF de igual modo que ocurre en el período crítico visual (Wolansky y col. 1999 (a, b)).

4.1.1. Cambio en el número de receptores NMDA durante el desarrollo postnatal

La fracción subcelular utilizada para realizar el análisis de la cuantía de receptores NMDA ha sido la fracción de membrana sináptica 1 M. Previamente, se ha demostrado mediante ensayos de Western blot que la fracción de membrana sinaptosomal se encuentra enriquecida con las proteínas NR1, NR2A y NR2B (Portera-Cailliau y col. 1996).

Los resultados presentados en este trabajo muestran un patrón de cambios en el número de receptores NMDA durante el desarrollo postnatal estriatal. Durante las tres primeras semanas del desarrollo postnatal se aprecian valores elevados y similares en la cuantía de receptores. Al PN 24 el nivel de receptores

decae notoriamente y se reestablece al PN 28, a partir del PN 35 se manifiesta una tendencia de disminución gradual en los niveles del receptor hasta alcanzar un valor moderado en el adulto (PN 200). Ya que no se observan variaciones significativas en los valores de K_d del receptor en el período estudiado, los cambios deben interpretarse como una modificación en el número de receptores pero no en la afinidad.

Cambios en los niveles de receptores NMDA mediante el uso de radioligandos (binding) durante el desarrollo postnatal ya han sido mostrados en el sistema nervioso central. Las áreas más estudiadas empleando la metodología de binding han sido el hipocampo (Baudry y col. 1981, Morin y col. 1989, Insel y col. 1990) y la corteza visual (Erdö y Wolf 1990, Kumar y col. 1994). En cuerpo estriado al menos tres estudios previos han examinado la ontogenia del NMDA mediante esta metodología, pero los resultados reflejan controversia. En el primero de ellos, se muestra que el binding del receptor permanece constante durante el desarrollo (Insel y col. 1990), el siguiente trabajo informa que se produce un incremento gradual hasta el PN 25 (Subramaniam y McGonigle 1994) posteriormente, en el trabajo de Colwell y col. (1998) este incremento es observado hasta el PN 28 y un menor valor al PN 60. Similar a éstos últimos resultados, en este trabajo de Tesis se observan valores parejos del nivel del receptor al PN 20 y 28 y un menor valor al PN 60. No pudiendo descartarse la ocurrencia de la disminución al PN 24 ya que dicha edad no ha sido estudiada por esos autores. Este resultado podría correlacionarse con el trabajo de Butler y col. (1998) en el cual, mediante microscopía electrónica, establecen una aguda disminución (50 %) en la densidad de sinapsis asimétricas en el estriado dorsolateral de ratas entre el PN 18 y 25. Además, también verifican una baja cuantía de sinapsis asimétricas en el adulto.

4.1.2. Cambio en la composición de las subunidades del receptor NMDA durante el desarrollo

Las tres subunidades analizadas en este trabajo, NR1, NR2A y NR2B, son las que se encuentran mayoritariamente expresadas tanto en cuerpo estriado como en otras áreas del cerebro de rata (Watanabe y col. 1992, Wenzel y col. 1997).

En este estudio se ha empleado la metodología de RT-PCR que es considerada una metodología que presenta alta sensibilidad y ya ha sido utilizada previamente para semicuantificar cambios en el RNAm de las subunidades del receptor (Lau y col. 2003). Los diversos RNAm de las subunidades han sido identificados en las neuronas proyectivas estriatales (gabaérgicas) y en las interneuronas medianas y gigantes (gabaérgicas y colinérgicas, respectivamente), (Standaert y col. 1994, 1999; Landwehrmeyer y col. 1995). Los resultados aquí presentados indican que cada subunidad del receptor NMDA desarrolla un patrón diferencial de expresión de su RNAm. Estos patrones pueden clasificarse según dos tendencias durante las primeras semanas del desarrollo: 1) altos niveles de expresión desde el PN 6 y leve incremento hasta el PN 20 y PN 24 (NR1 y NR2A, respectivamente); 2) bajos niveles de expresión desde el PN 6 sin cambios hasta el PN 24 (NR2B). Sin embargo, estudios previos demuestran una disminución de los niveles de expresión de NR1 del PN 7 al PN 14 y sin modificación para NR2A (Lau y col. 2003). En las tres subunidades aquí estudiadas se produce una abrupta disminución de su expresión, al PN 24 en NR1 y al PN 28 en NR2A y NR2B. Si bien en el caso de NR1 y NR2A se recupera el nivel de expresión del RNAm al siguiente PN estudiado (28 y 35), NR2B presenta una recuperación más gradual (PN 40). En los tres casos hay una progresiva disminución de los niveles de expresión alcanzándose valores muy bajos en la adultez (PN 200).

Como es sabido, la subunidad NR1 es necesaria para la actividad de canal iónico del receptor (Moriyoshi y col. 1991, Gasic y Hollmann 1992, Meguro y col. 1992, Nakanishi y col. 1998). Lai y col. (2000) demostraron que una disminución en la síntesis de la proteína NR1 puede disminuir la densidad o la cantidad de canales funcionales en las neuronas. Esto eventualmente podría causar un desarreglo en las funciones fisiológicas mediadas por el receptor NMDA en los ganglios basales. Aún no se conoce si este cambio se produce a nivel sináptico o no. Los mismos autores demostraron que la expresión de NR1 puede modular diferencialmente la expresión de la subunidad NR2A en las neuronas estriatales. Lo cual podría estar indicando que la expresión de la

subunidad NR2A se ajusta a un proceso dinámico y dependiente de la presencia de NR1.

Estas observaciones podrían correlacionarse con lo mostrado en este trabajo donde, durante el desarrollo postnatal temprano, la disminución en la expresión de la subunidad NR1 es temporalmente precedente a la NR2A. Bajo la misma interpretación podría explicarse la disminución de la subunidad NR2B al PN 28. Bajo este mismo razonamiento pueden correlacionarse el perfil ontogenético del número de receptores NMDA con la expresión de la subunidad NR1. De esta manera, podría considerarse que los cambios en la expresión de las subunidades del receptor NMDA durante el desarrollo contribuyen al patrón de maduración de los receptores NMDA funcionales.

Resulta difícil contrastar estos resultados con la bibliografía existente, ya que en los trabajos publicados son escasas las edades estudiadas y en la mayoría de ellos, el PN adulto no está especificado. Sin embargo puede encontrarse similitud de los datos obtenidos en el trabajo de Lau y col. (2003) ya que estos autores también encuentran bajos niveles de expresión en el adulto para las tres subunidades estudiadas, y estos niveles también son más bajos que al PN 6. Estos resultados en conjunto indicarían que es probable que no todos los genes de las subunidades NR estén expresados de igual manera desde el nacimiento. Hay un cambio dinámico en la expresión genética de las subunidades del receptor NMDA durante el desarrollo postnatal.

4.1.2.1 Diferencias en la expresión de la inmunoreactividad de las subunidades

En otros trabajos también se ha observado un patrón diferencial de cambios en la inmunoreactividad de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo postnatal. Cambios en la composición de las subunidades NR durante el desarrollo han sido identificados en otras regiones del cerebro de rata como la corteza, el cerebelo y el hipocampo (Monyer y col. 1994, Sheng y col. 1994, Sucher y col. 1995, Portera-Cailliau y col. 1996, Chen y col. 2000, Erisir y Harris 2003, Mower y Chen 2003). En cuerpo estriado, los patrones de

expresión de inmunoreactividad de las subunidades del receptor NMDA son más complejos que los de expresión del RNAm. Cada subunidad exhibe diferente patrón de expresión de inmunoreactividad.

En estudios previos, los autores Benke y col. (1995) encontraron un aumento de inmunoreactividad de NR1 desde el PN 1 hasta el PN 21 en distintas áreas del cerebro de rata, incluyendo cuerpo estriado. Acorde a este resultado, también se encontró un aumento de la inmunoreactividad de NR1 en estriado hasta el PN 21, manteniéndose este valor elevado en el adulto (60-90 días), (Nansen y col. 2000). En contraposición, otros autores evidenciaron una disminución de inmunoreactividad de NR1 al PN 7, con un aumento al PN 14 cuyo valor asemeja al PN 1 y luego una leve disminución al PN adulto (> 90 días), (Lau y col. 2003). A diferencia de la subunidad NR1, los mismos autores observan una tendencia opuesta en la inmunoreactividad de NR2B. Del PN 1 al PN 7 se produce un aumento de inmunoreactividad, la cual es reducida a su valor mínimo al PN 14 y nuevamente aumenta al PN adulto. Este resultado es concordante con previos estudios en los que al PN 10 se encuentra un valor de inmunoreactividad de NR2B cercano al valor adulto (Portera-Cailliau y col. 1996, Wenzel y col. 1997).

En cuanto a la inmunoreactividad de la subunidad NR2A se detectan bajos niveles al PN 1, con una disminución mayor que la observada en NR1 al PN 7 y luego una tendencia de aumento hacia el PN 14 y mayor aún en el adulto (Lau y col. 2003). Por otra parte, en estudios previos no se observa inmunoreactividad de esta subunidad hasta el PN 26, siendo la siguiente edad estudiada el PN adulto (60-90 días) en la cual se evidencia un valor menor (Portera-Cailliau y col. 1996). Posteriormente, otros autores, detectan un aumento progresivo hasta el PN 21 y leve disminución al PN adulto (Wenzel y col. 1997).

Los cambios en la expresión de las subunidades del receptor NMDA durante las tres primeras semanas postnatales podrían ser causados por la llegada de aferencias durante la formación de sinapsis que ocurre postnatalmente. Los receptores estriatales podrían ejercer un efecto trópico en la correcta inervación del estriado, colaborando en la atracción de las fibras corticales. La corteza

prelímbrica inerva el estriado entre el PN 1 y PN 3 (Nisenbaum y col. 1998). Esta inervación se desarrolla luego de la inmunodetección de las subunidades NR1, Glu R1 y Glu R2/3 (subunidades del receptor AMPA). Esta secuencia temporal indica que los receptores de glutamato podrían ser necesarios para que se produzca la correcta aferencia cortical. La arborización corticoestriatal se forma alrededor del PN 2 y llena el estriado al PN 7 cuando la inmunoreactividad de las subunidades de los receptores NMDA y AMPA aún se encuentra sectorizada, pero en transición al patrón homogéneo del animal adulto (Sheth y col. 1998). Durante este período temprano del desarrollo, el cuerpo estriado expone una débil respuesta electrofisiológica al NMDA (Colwell y col. 1998), indicando que los receptores NMDA aún se están desarrollando. La maduración de esta respuesta electrofisiológica es detectada al PN 14.

4.1.2.2 Cambio en la composición de las subunidades del receptor NMDA en las neuronas espinosas medianas durante el desarrollo

Se ha analizado el patrón de expresión de inmunoreactividad de las subunidades NR en neuronas estriatales mediante inmunohistoquímica (Lau y col. 2003). Los datos presentados por estos autores indican que la mayor cantidad de subunidad NR1 es expresada durante la maduración de las neuronas espinosas medianas. La expresión de los receptores NMDA está cercanamente correlacionada con la maduración neuronal (Komuro y Rakic 1993, Michaelis 1998, Behar y col. 1999, Ikonomidou y col. 1999), siendo NR1 la subunidad que forma el canal (Moriyoshi y col. 1991, Gasic y Hollmann 1992, Meguro y col. 1992, Nakanishi y col. 1998), se observa una clara tendencia que muestra una correlación positiva de expresión-maduración en las neuronas espinosas medianas. En un estudio previo realizado mediante la utilización de microscopía electrónica se muestra que la densidad de las sinapsis asimétricas aumenta durante el desarrollo postnatal (Butler y col. 1998, Sharpe y Tepper 1998). La inmunoreactividad de NR1 ha sido localizada en el centro de las sinapsis que forman contactos sinápticos asimétricos con

espinas en ratas adultas, particularmente, en la cabeza de las espinas (Bernard y Bolam 1998). Por lo cual, es probable que la mayor cantidad de la subunidad NR1 se exprese y localice en las espinas durante el desarrollo de las neuronas espinosas medianas.

Por otra parte, también se han encontrado cambios en las subunidades NR2 en las neuronas espinosas medianas durante el desarrollo. En estudios de hibridación *in situ* se mostró que las neuronas espinosas medianas en ratas adultas expresan predominantemente el RNAm de la subunidad NR2B y moderadamente el RNAm de NR2A (Standaert y col. 1994, 1999; Landwehrmeyer y col. 1995, Küppenbender y col. 2000). Consistentemente con otros trabajos (Standaert y col. 1994, 1999; Landwehrmeyer y col. 1995), en esta Tesis se observa que la expresión del RNAm de NR2A disminuye durante el desarrollo, alcanzando niveles bajos en el adulto.

Si bien en este trabajo, la porción de cuerpo estriado utilizada para el estudio de la expresión del RNAm de las subunidades involucra tanto las neuronas espinosas medianas como las interneuronas, es sabido que más del 95% de las neuronas estriatales son espinosas medianas (Graybiel 1990, Gerfen y Wilson 1996, Rymar y col. 2004). Por lo cual, los datos mostrados en este trabajo estarían reflejando el cambio en la expresión de las subunidades NR en neuronas espinosas medianas más que en las interneuronas. .

4.1.2.3 Las interneuronas estriatales expresan diferentes subunidades del receptor NMDA durante el desarrollo

En diversos estudios se informó que las interneuronas estriatales desarrollan diferentes patrones de expresión del RNAm de las subunidades NR en ratas adultas (Standaert y col. 1994, 1999; Landwehrmeyer y col. 1995, Küppenbender y col. 2000). Así también, inmunoreactividad de estas subunidades ha sido encontrada en interneuronas estriatales de animales adultos (Chen y Reiner 1996, Chen y col. 1996; Bernard y Bolam 1998, Küppenbender y col. 1999). Aunque el patrón de expresión celular de las subunidades NR en las interneuronas estriatales durante el desarrollo no ha

sido extensamente estudiado, más recientemente ciertos autores (Lau y col. 2003) lograron una descripción más detallada. Al PN 14 las interneuronas inmunoreactivas para parvalbúmina (PV, gabaérgicas) manifiestan un nivel elevado de NR1 con una moderada inmunoreactividad de NR2A, mientras que NR2B permanece sin cambio. A pesar de la diferencia observada en las neuronas PV-inmunoreactivas, las interneuronas inmunoreactivas para ChAT (colinérgicas) muestran inmunoreactividad similar de las tres subunidades al PN 14. Los niveles de NR1 y NR2A aumentan en el adulto mientras que el nivel de expresión de NR2B permanece sin cambios (Lau y col. 2003).

Mecanismos mediados por el NMDAR son cruciales en la proliferación prenatal de las interneuronas GABAérgicas, PV-inmunoreactivas, (Sadikot y col. 1998). Las interneuronas estriatales reciben las aferencias sinápticas glutamatérgicas, las cuales se presume que arriban al estriado después del PN 21 (Tepper y Trent 1993, Tepper y col. 1998). Sin embargo, poco se conoce acerca de los cambios en las propiedades funcionales de las interneuronas estriatales durante el desarrollo *in vivo*.

4.1.3. Consideraciones fisiológicas

Como ha sido mencionado anteriormente, la disminución en la expresión del receptor NMDA y sus subunidades durante el desarrollo postnatal temprano podría estar directamente relacionada con la pérdida en el número de sinapsis asimétricas que se produce en el estriado entre el PN 18 y 25 (Butler y col. 1998). Este dato estaría indicando un período de intenso remodelado sináptico en el cuerpo estriado de rata durante esa edad postnatal; lo cual también sugeriría que los receptores NMDA poseen un rol en la regulación del número de sinapsis durante este período del desarrollo estriatal. Congruentemente, estos autores han demostrado que la administración sistémica diariamente del antagonista no competitivo MK-801, el cual atraviesa la barrera hematoencefálica, desde el PN 18 y hasta el PN 20 disminuye la densidad de sinapsis asimétricas al PN 21 (Butler y col. 1999). Este efecto fue específico de sinapsis glutamatérgicas, ya que la densidad de sinapsis simétricas no se modificó por el tratamiento. Resulta probable que el efecto de MK-801 en el número de

sinapsis fuese en consecuencia a una disminución en la entrada de calcio a través de los NMDARs más que a un efecto indirecto por la disminución en la excitabilidad neuronal. La pérdida de sinapsis asimétricas inducida por el bloqueo de los receptores NMDA hace reminiscencia de la correlación entre la disminución de las corrientes a través de estos receptores y la pérdida de sinapsis observada en el tectum óptico de la rana (Hickmott y Constantine-Paton 1997). Sugiriendo de esta manera, que el mantenimiento de sinapsis glutamatérgicas durante este periodo de intenso remodelado en el estriado, es dependiente de la estimulación de los receptores NMDA.

En términos de la regulación de la cantidad de receptores también deben considerarse los niveles de kinasas y fosfatasas, las cuales son modificadas durante el desarrollo estriatal (Sakagami y Kondo 1993, Sakagami y col. 1994, Raghunathan y col. 1996, Matsuoka y col. 1997). Es probable que el nivel de fosforilación del receptor NMDA, proceso que regula la corriente a través del canal, cambie en el estriado durante el desarrollo. Por otra parte, los niveles de actividad enzimática de GAD (síntesis de GABA), como los niveles de la proteína y del RNAm de la isoforma GAD67 incrementan durante las tres primeras semanas del desarrollo estriatal, sugiriendo de esta manera, que un aumento de la inhibición podría contribuir a una disminución en la eficacia del NMDAR (Greif y col. 1992, Ceresoli y col. 1996, Plotkin y col. 2005).

4.2. EFECTOS DEL TEC EN LA SINÁPSIS GLUTAMATÉRGICA DEL CUERPO ESTRIADO

Con el objetivo de estudiar los cambios producidos en el sistema glutamatérgico estriatal, en particular sobre los receptores NMDA, ratas de 20, 30 y 40 días realizaron un entrenamiento motor durante 7 días consecutivos. Para ello, se utilizó el TEC como factor generador de la actividad física. La actividad desarrollada en este paradigma comportamental incluye un componente meramente motor, un componente de aprendizaje motor y asociativo y otro componente motivacional. Como ha sido citado anteriormente, la actividad fisiológica desarrollada en este test sólo entre los días postnatales 30-37 induce cambios neuroquímicos y moleculares tanto transitorios como permanentes (Ibarra y col. 1995, 1996; Paratcha y col. 1998, 1999; Azcurra y col. 2003, Soiza-Reilly 2004) en cuerpo estriado de rata. Los cambios neuroquímicos se ven reflejados en la disminución de receptores colinérgicos muscarínicos y dopaminérgicos (subtipo D2) estriatales. En conjunto, estos datos permitieron establecer un período crítico de plasticidad dependiente de actividad del cuerpo estriado de rata. Con estos antecedentes mencionados, se buscó determinar los efectos de la estimulación motora en los receptores NMDA.

4.2.1. Disminución del número de receptores NMDA en animales entrenados a los 20 días postnatales

Los resultados experimentales obtenidos a partir de estriado de animales que realizaron el TEC a los 20 días postnatales demuestran que la actividad funcional realizada en este paradigma produce una reducción de aproximadamente 40 % en el $B_{m\acute{a}x}$ del NMDAR. Considerando que el parámetro K_d permanece sin cambio, la reducción observada se interpreta como una disminución del número de receptores en la fracción estudiada (membrana sináptica 1 M).

Ya que el TEC presenta una actividad giratoria, que equivale a una respuesta motora asimétrica, fue necesario evaluar cuerpo estriado derecho e izquierdo

por separado. De esta manera se contemplarían respuestas diferenciales, ya que la actividad en cada una de las estructuras mencionadas podría presentar variaciones cuantitativas o cualitativas para diversos parámetros neuroquímicos. No obstante, en este estudio se encontró que el efecto de la estimulación motora en los NMDARs es simétrico y de magnitud similar para ambos estriados.

También en relación al TEC, el efecto de este test podría estar asociado a la actividad motora, el aprendizaje motor, el aprendizaje asociativo, el factor motivacional o una combinación de estas variables. Es por ello, que el diseño experimental en el TEC no permite excluir ninguna de las mencionadas variables como generadores de la modificación en los receptores NMDA. Sin embargo, en estudios previos se determinó que los efectos de la estimulación motora sobre los mAChR y D2 durante el período crítico estriatal también eran observados cuando la actividad se realizaba en el test de disco giratorio (TDG), en el cual están ausentes el componente de aprendizaje y el factor motivacional (Ibarra 1997, Tesis Doctoral).

Existen estudios que relacionan de manera directa al receptor NMDA con la actividad motora (Facchinetti y col. 1993, Akopian y Walsh 2006, Centonze y col. 2008). Específicamente, estudios farmacológicos en los cuales se han empleado ligandos específicos para los receptores NMDA han demostrado que estos receptores están involucrados en el control motor (Thanos y col. 1992). En dicho trabajo la microinyección unilateral de NMDA en el estriado produjo un aumento dosis-dependiente en el movimiento rotatorio contralateral. En estos estudios también se demuestra que los efectos motores del glutamato sobre los NMDARs en el estriado requieren la estimulación concomitante de los receptores de dopamina en la misma región. Previamente, otros autores también habían informado un movimiento rotatorio contralateral seguido a la microinyección de L-glutamato, L-aspartato, NMDA, quisquilato o kainato (Toth y Lajtha 1989). Posteriormente, la función de los receptores NMDA en el procesamiento de las funciones motoras por el estriado ha sido estudiada en mayor profundidad. Ciertas evidencias indican que la administración intraestriatal de un oligonucleótido antisentido específico para la subunidad

NR1 causó importantes alteraciones en la regulación del comportamiento motor en ratas. Los animales manifestaron posturas anormales y rotación espontánea ipsilateral al sitio de inyección (Standaert y col. 1996). En este caso, la dirección del movimiento rotatorio es opuesta a la producida por la microinyección del agonista NMDA observada en otros estudios (Thanos y col. 1992). Confirmando los resultados de Standaert y col (1996) otros autores también evidenciaron que la administración unilateral del oligonucleótido antisentido para NR1 produjo movimiento rotacional ipsilateral (Lai y col. 2000). En conjunto estos resultados permitirían argumentar que deficiencias motoras causadas por un desbalance de las vías eferentes estriatales pueden deberse al bloqueo unilateral de los receptores NMDA funcionales en el estriado.

En los últimos años, crecientes avances mediante el uso de técnicas moleculares y bioquímicas han contribuido considerablemente al establecimiento de un papel fundamental de los NMDARs en procesos de aprendizaje y memoria. Diversos estudios correlacionan la expresión del receptor NMDA con la capacidad para aprender, ellos incluyen procesos de envejecimiento en los cuales los NMDARs disminuyen en hipocampo de ratas (Barnes 1979). Además, se ha observado que pacientes con la enfermedad de Alzheimer poseen niveles disminuidos de glutamato y de densidad de receptores NMDA en esta estructura (Ulas y col. 1992). Asimismo, el binding de este receptor en cuerpo estriado y tálamo se observa disminuido en animales viejos en comparación con jóvenes (Magnusson y Cotman 1993), estas observaciones denotan modificación de la plasticidad sináptica (García y Jaffard 1993). Estos hallazgos podrían ser responsables del declive de la memoria durante el envejecimiento. En concordancia con estos datos, se ha informado que ratas con alta capacidad de aprendizaje, testeada en un paradigma de memoria espacial, mostraron elevados niveles de NMDARs en hipocampo (Stecher y col. 1997). En clásicos experimentos asociativos de condicionamiento por temor, se ve una inducción duradera del aumento en la liberación de glutamato en sinaptosomas del giro dentado de hipocampo (Doyère y col. 1995). El bloqueo de los NMDARs durante el aprendizaje impidió

el condicionamiento y el aumento en la liberación de glutamato. En otro sistema, el olfatorio, ciertos autores determinaron que un aumento de actividad en la corteza olfatoria durante los días PN 16-23 produjo una disminución de los receptores NMDA sinápticos (Franks e Isaacson 2005). Considerando el conjunto de estos resultados previos, y los actuales presentados aquí, resulta concebible que un incremento en la liberación del neurotransmisor glutamato sea contrarrestado por una reducción en el número de receptores NMDA (o en la composición de subunidades) para prevenir la sobreestimulación y excitotoxicidad. O sea, una elevada actividad neuronal puede correlacionarse con una reducida expresión del receptor NMDA. Las causas probables que lleven a una reducción de receptores pueden ser variadas y no logran ser dilucidadas en este trabajo.

4.2.1.1. Posibles causas para la reducción de receptores NMDA

Las posibles causas que expliquen el cambio observado en los receptores NMDA luego del entrenamiento en el TEC son variadas: I) el número de receptores se encuentra disminuido por la disminución del número de neuronas, II) por la reducción del número de sinapsis por neurona o III) el número de neuronas y sinapsis se mantiene constante, pero disminuye la densidad de receptores en membrana. También podría explicarse por una combinación de estas hipótesis. Si bien en este trabajo no se dilucida experimentalmente la respuesta, es válido realizar algunas consideraciones con respecto a las posibles causas planteadas.

I) Hipótesis de muerte neuronal: en el cuerpo estriado, el período de muerte celular programada se encuentra prenatalmente determinado y puede observarse en los primeros días de desarrollo postnatal (Portera-Cailliau y col. 1997). Si bien a la edad en la que se realiza el entrenamiento los eventos masivos de apoptosis ya se han producido, es posible que la estimulación motora afecte neuronas aún sensibles. En este sentido, la actividad excesiva del receptor NMDA ha demostrado tener un efecto excitotóxico (Greene y Greenamyre 1996, Greene y col. 1998), y teniendo en cuenta que este receptor

se expresa en todos los tipos neuronales estriatales, podría ser factible esta hipótesis.

II) Hipótesis de reducción de sinapsis: la disminución de receptores podría explicarse con una disminución de la arborización dendrítica y por ende de sinapsis. En distintos sistemas, principalmente el visual, la activación del receptor NMDA provoca el refinamiento de proyecciones nerviosas. Ciertos autores demostraron que el receptor NMDA es necesario para el refinamiento topográfico de las proyecciones retinocoliculares. La actividad glutamatérgica elimina largas porciones de axones y reduce la arborización dendrítica (Simon y col. 1992). También se ha visto que la activación de los NMDARs en células de hipocampo en cultivo produce un aumento del podado de espinas dendríticas a largo plazo (Goldin y col. 2001).

Esta argumentación de los cambios encontrados en el receptor NMDA es coherente con la evaluación realizada por Singer sobre los procesos de plasticidad cortical durante el desarrollo (Singer 1995). Dicho autor plantea que la arquitectura básica y las conexiones de la corteza se establecen según un programa predeterminado independiente de la experiencia. La maduración de esas conexiones y la reorganización de los circuitos se establecen según la actividad. Este evento ocurre en un período limitado durante el desarrollo, donde la remodelación permite cambios importantes del patrón de conectividad.

III) Hipótesis de reducción de la densidad de receptores por sinapsis: en este caso el patrón de conectividad puede no modificarse y la cantidad de receptores por sinapsis disminuir por mecanismos de optimización sináptica mediante interacciones con la glía. Es posible que la etapa en la que se realiza el TEC sea un período de consolidación final de algunos parámetros involucrados en la neurotransmisión y funcionalidad del cuerpo estriado. Uno de los sucesos de la maduración final podría ser el establecimiento de los niveles adecuados de neuroreceptores en las sinapsis. Es posible especular que las neuronas exponen inicialmente un número de neuroreceptores mayor al necesario, posteriormente esta cantidad se modifica a partir de la actividad funcional que determinará el área sináptica final. Para esto, existiría un período determinado, luego del cual los niveles “normales” quedarían establecidos.

4.2.1.2. Receptores de glutamato y su participación en LTP y LTD

La perspectiva farmacológica puede aportar valiosa información para el análisis del mecanismo que lleva a la reducción de los receptores, es sabido que la administración crónica de un fármaco puede producir cambios plásticos en los niveles de receptores. Suspendido el tratamiento farmacológico, la neurona suele reestablecer sus niveles “normales” de receptores. Es posible que parte de esta regulación responda a un componente genético, pero varios aspectos del SNC demuestran que en este sistema se pueden combinar factores genéticos y ambientales para una mejor adaptación funcional. Por lo cual podría ser cierto, que las neuronas del estriado, luego de distintos pasos de maduración neuroquímica, se encuentren en condiciones de determinar sus niveles “normales” de receptores en el momento en que se genera una actividad funcional exagerada. En el paradigma empleado en este estudio, a lo largo de los 7 días de entrenamiento, cada animal recorre aproximadamente 900 metros, actividad no comparable con la que se realiza dentro de la jaula. En consecuencia, las neuronas del estriado están recibiendo una estimulación glutamatérgica mayor, aunque totalmente dentro de los límites de actividad fisiológica espontánea para los que el sistema está evolutivamente adaptado. Si en este período las neuronas deben establecer la nivelación de los sistemas de neurotransmisión, es esperable que los resultados sean distintos a los observados en animales no entrenados.

Una posible explicación para estos eventos es la participación de los receptores NMDA en procesos de LTP y LTD, dichos procesos pueden modificar el patrón de conectividad nerviosa (Singer 1995). En cuerpo estriado, la estimulación glutamatérgica cortical actúa tanto sobre las neuronas GABAérgicas como sobre las interneuronas colinérgicas (Standaert y col. 1994, 1999; Landwehrmeyer y col. 1995). El proceso de LTP corticoestriatal requiere un gran incremento del Ca^{++} postsináptico a través de la activación de los NMDARs, como también la estimulación de los receptores muscarínicos de ACh, subtipo M1 (Gubellini y col. 2004). El glutamato liberado de las fibras corticoestriatales durante una estimulación tetánica activa los receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA) y metabotrópicos (mGluRs), en las neuronas espinosas medianas la

activación de los NMDARs y el grupo I de los mGluRs (mGluR1) aumenta los niveles de Ca^{++} intracelular a través de un mecanismo directo y mediado por segundos mensajeros (Stefani y col. 1996, Fagni 2000). A su vez, este evento aumenta la función de los receptores NMDA y AMPA por medio de la activación de mecanismos Ca^{++} -dependientes (Calabresi y col. 1996). La activación de los mGluRs despolariza las interneuronas colinérgicas facilitando así, la liberación de ACh (Pisani y col. 2001 (a)), de esta manera, la estimulación del subtipo M1 en las neuronas espinosas contribuye a un incremento en los niveles de Ca^{++} intracelular en esas células (Gubellini y col. 2004). Sin embargo, el incremento en los niveles de Ca^{++} intracelular postsináptico es también requerido para la inducción de LTD, proceso de plasticidad sináptica opuesto a LTP (Calabresi y col. 1994, 1996). Es por esto, que resulta esperable que una delicada regulación de los niveles de Ca^{++} postsináptico cumplan un papel fundamental en el balance entre LTD y LTP en las sinapsis corticoestriatales.

Se ha postulado que una alterada transmisión glutamatérgica es la base fisiopatológica de diversos desórdenes neurodegenerativos que involucran el cuerpo estriado, como la corea de Huntington (Beal y col. 1986, Greene y Greenamyre 1996, Greene y col. 1998). En este contexto, y con lo mencionado anteriormente, la modulación positiva de los NMDARs por los mGluR1 puede ejercer una función crucial en el incremento de la señal glutamatérgica a niveles excitotóxicos llevando a la pérdida selectiva de las neuronas espinosas estriatales. Por último, y en concordancia con estos datos, se ha demostrado que una estimulación cortical repetitiva produce una disminución de la transmisión excitatoria en el estriado mediante la activación de los mGluRs y la co-activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Calabresi y col. 1992 (a, c)). De esta manera, el LTD estriatal disminuye la actividad de las neuronas espinosas GABAérgicas lo cual influye en las vías eferentes del estriado hacia otras estructuras de los ganglios basales y en el control de la actividad motora.

4.2.2. Reducción de las subunidades del NMDAR en animales entrenados a los 20 días postnatales

En este trabajo se muestra que el TEC provoca una reducción del 50 % en los niveles de expresión del RNAm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA. Este efecto sólo es observado en animales entrenados a los 20 días postnatales. Los grupos experimentales que realizaron el entrenamiento a los 30 o 40 días postnatales no manifiestan variaciones en los niveles de expresión del RNAm de las NRs respecto a los controles no entrenados. Este resultado experimental se correlaciona consistentemente con la reducción observada en el número de receptores NMDA sólo en animales entrenados a los 20 días PN. Si bien el valor del cambio observado en ambos casos (número de receptores y expresión del RNAm) no coincide exactamente, la diferencia puede deberse meramente a la sensibilidad que presentan las metodologías utilizadas. Otro punto a destacar aquí es que el efecto de la estimulación motora en la expresión del RNAm de las NRs también es simétrico y de magnitud similar para ambos estriados (derecho e izquierdo). Como así también que la disminución de la expresión entre las distintas subunidades resulta similar. Dado que los animales fueron sacrificados al PN 74, o sea 47 días después de finalizado el entrenamiento, puede establecerse que los cambios detectados son permanentes.

Existe abundante bibliografía que relaciona la expresión de las subunidades del receptor NMDA con fenómenos de plasticidad. En este contexto el área más estudiada es la corteza visual, donde la composición de las NRs varía durante el desarrollo y durante el período crítico de este área (Nase y col. 1999, Roberts y Ramoa 1999, Berardi y col. 2000, Mower y Chen 2003) y esta variación es dependiente de la actividad neuronal (Simeone y col. 2004). Durante el período crítico visual se produce un cambio en la cantidad de receptores conteniendo la subunidad NR2B a una alta cuantía de receptores conteniendo la subunidad NR2A. La expresión de esta subunidad se correlaciona con un acortamiento progresivo de la corriente NMDA. En este sistema, el rearrreglo causado por la oscuridad retarda la expresión de la subunidad NR2A sugiriendo que el pasaje de NR2B a NR2A está relacionado al desarrollo cortical y posiblemente, a la

finalización del período crítico y la plasticidad visual (Roberts y Ramoa 1999, Berardi y col. 2000). Además, la cantidad de proteína NR2A en las sinapsis corticales, y en consecuencia la relación NR2A/NR2B, está estrechamente regulada por la experiencia sensorial (Quinlan y col. 1999).

En el sistema olfatorio en ratas ciertos autores hipotetizaron y corroboraron que si el aprendizaje induce un incremento de la subunidad NR2A con respecto a NR2B, entonces el mantenimiento de la memoria puede ser debido a un incremento en el umbral para un posterior refuerzo sináptico. El incremento en la relación NR2A/NR2B resulta en un acortamiento de la corriente postsináptica excitatoria mediada por el NMDAR, lo cual puede inducir a la plasticidad sináptica NMDA-dependiente durante el aprendizaje, y servir para mantener la memoria codificada por la experiencia (Quinlan y col. 2004).

Con respecto a la participación de la expresión de las subunidades NRs en los sistemas motores ciertos autores han mostrado una relación directa entre las subunidades y el control motor (Thanos y col. 1992, Standaert y col. 1996, Lai y col. 2000). Específicamente en esos trabajos se observa que el bloqueo unilateral de la expresión de la subunidad NR1 en estriado de ratas induce movimiento rotatorio. En este estudio se demuestra que el entrenamiento circular produce una disminución en la expresión de las subunidades del NMDAR. En relación a los datos ontogenéticos aquí presentados, es interesante remarcar que dentro del rango de edades en que se desarrolla el TEC (PN 20-27) ocurren importantes disminuciones en los niveles de expresión de las 3 subunidades estudiadas. Al PN 24 se produce una marcada disminución en los niveles del RNAm de NR1 y al PN 28 esta disminución es observada para NR2A y NR2B. Lo cual podría estar indicando la inmadurez del sistema, al momento de efectuar el entrenamiento, y por ende la posibilidad de inducir plasticidad motora. En relación a esta observación, se ha demostrado mediante microscopía electrónica en corteza visual que la subunidad NR2B manifiesta una considerable reducción concurrentemente con la finalización del período crítico (Erisir y Harris 2003).

Otra importante consideración es que el cambio en la expresión del RNAm de las subunidades se encuentra correlacionado con los valores observados en la

proteína. Lo que no se puede determinar con los datos de este trabajo de Tesis es cuál evento ocurre primero como consecuencia de la actividad funcional.

4.2.3. El efecto del TEC sólo se evidencia cuando se realiza a los 20 días postnatales

La disminución observada en los receptores NMDA es específica y particular de un período determinado del desarrollo postnatal, al igual que ha sido verificado para el sistema colinérgico-dopaminérgico. En este estudio se comprueba que los efectos del entrenamiento sólo se manifiestan cuando los animales son entrenados a los 20 días postnatales y no a los 30 o 40 días postnatales. Como ya ha sido mencionado, el período crítico estriatal para el sistema colinérgico-dopaminérgico se manifiesta cuando el entrenamiento se realiza exclusivamente a los 30 días postnatales, no antes (20 días) o después (40 días), (Ibarra y col. 1995, 1996). Los resultados aquí presentados demuestran que el sistema glutamatérgico no se ve afectado por el entrenamiento realizado fuera del rango de edades PN 20-27, indicando claramente la presencia de un período limitado donde las modificaciones del sistema pueden producirse mediante estimulación fisiológica. Dicha observación muestra que la plasticidad motora en esta estructura cerebral presenta gran similitud, en cuanto a esta característica, con la plasticidad del sistema visual descrita inicialmente por Hubel y Wiesel (1962), (Wiesel 1982). No obstante, en este caso se observa que el período de sensibilidad es mucho más acotado. Aunque no ha sido estrictamente definido, ya que los entrenamientos iniciados a los 30 y 40 días no producen modificación, podría afirmarse que este período limitado de sensibilidad se prolonga por no más de 10 días. Diferenciándose así del período crítico visual el cual perdura alrededor de 30 días (dudek y bear 1989).

El hecho de que el período crítico estriatal para el sistema colinérgico-dopaminérgico se manifiesta cuando los animales realizan el entrenamiento a los 30 días de edad puede deberse a que esta estructura nerviosa presenta características neuroquímicas muy diferentes a las encontradas 10 días antes. Estudios ontogenéticos muestran, alrededor de los 30 días postnatales, una tendencia a la estabilización en los parámetros relacionados con la

neurotransmisión colinérgica luego de haber alcanzado sus niveles máximos (Tarazi y col. 1998). En el caso de los receptores NMDA la situación es diferente ya que la maduración funcional de estos receptores es previa a la del sistema colinérgico-dopaminérgico. De hecho, en estudios precedentes, se observa una respuesta electrofisiológica máxima al PN 14 y un aumento de receptores hasta el PN 28 (Colwell y col. 1998).

La posibilidad de que exista un período de sensibilidad para el sistema glutamatérgico en el cual los niveles de neuroreceptores puedan ser modificados en forma sustancial, 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, realizaron diversos estudios sobre el efecto de la administración de neurolépticos sobre la densidad de receptores (Miller y Friedhoff 1986, 1988). Encontraron que la administración prenatal y postnatal de estos fármacos puede 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. Aunque los períodos no coinciden temporalmente, en ambos casos la interferencia con un sistema de neurotransmisión produce cambios a largo plazo y el período de sensibilidad es limitado. Estos autores se valen de una aproximación farmacológica, mientras que el modelo presentado en este trabajo utiliza una manipulación fisiológica.

4.2.4. Efecto a largo plazo inducido por el TEC

Otro punto a tener en consideración es el momento en que se manifiestan los cambios y su duración. Los cambios observados en el período crítico estriatal del sistema colinérgico-dopaminérgico fueron mostrados ser permanentes pero no inmediatos. La reducción de receptores mACh y D2 en animales entrenados no se manifestó inmediatamente luego de finalizado el entrenamiento sino a los 68-70 días PN. Por lo que existe una ventana temporal necesaria para que estas modificaciones se manifiesten. El tiempo de aparición de la disminución

de receptores es coincidente con la finalización de la maduración glial (Weir y col. 1984). En este trabajo aquí presentado, todos los análisis (salvo ontogenia) han sido realizados al PN 74 con el objetivo de cubrir la ventana temporal necesaria para que se evidencie el efecto de la estimulación motora.

4.2.5. Analogía con el pre-período crítico visual

Como ha sido bien establecido, en corteza visual se describió al período crítico como el tiempo durante el cual el cerrado transitorio de un ojo puede alterar la estructura de las columnas de dominancia ocular (CDO). Se conoce que estas CDO se forman a partir de la entrada de los axones talámicos glutamatérgicos a la corteza visual y hasta el inicio del período crítico para la deprivación monocular. El comienzo de la entrada de los axones talámicos a la corteza hasta el inicio del período crítico ha sido definido como pre-período crítico (Feller y Scanziani 2005). Además, durante este pre-período crítico para la dominancia ocular pequeños cambios en las cantidades relativas de excitación e inhibición pueden alterar marcadamente el procesamiento de la información. Este balance es dinámicamente ajustado en las capas corticales donde las conexiones inhibitorias se desarrollan más tardíamente que las conexiones excitatorias (Liu 2004, Long y col. 2005). La manipulación durante el pre-período crítico puede afectar tanto la actividad evocada visualmente como la espontánea.

En este contexto puede compararse este pre-período crítico con los resultados aquí presentados sobre las aferencias glutamatérgicas del cuerpo estriado durante el desarrollo. Como ha sido mencionado, la arborización corticoestriatal se forma alrededor del PN 2 y llena el estriado al PN 7 (Sheth y col. 1998). Durante este período temprano del desarrollo, la respuesta electrofisiológica del receptor NMDA es débil, madurando hacia el PN 14 (Colwell y col. 1998). En cuanto a las conexiones inhibitorias, se comprobó que la maduración funcional de las neuronas GABAérgicas estriatales ocurre hacia el PN 22 (Plotkin y col. 2005). En este período del desarrollo estriatal es cuando se produce la mayor sinaptogénesis corticoestriatal (Hattori y McGeer 1973, Sharpe y Tepper 1998).

En la descripción de ambos casos se observa una susceptibilidad a la inducción de cambios plásticos dependientes de actividad.

4.2.6. Efectos del TEC en proteínas sinápticas: Cambios en la expresión de PSD-95 pero no de Sinaptofisina

La inmunoreactividad de las proteínas PSD-95 y Sinaptofisina fue estudiada mediante ensayos de Western blot. Los resultados obtenidos indican una reducción del 45 %, aproximadamente, en los niveles de expresión de PSD-95 sólo en muestras de membrana sináptica de animales que realizaron el TEC a los 20 días postnatales. No obstante, los niveles de la proteína Sinaptofisina se mantuvieron inalterados en todos los grupos experimentales. Al igual que en los estudios realizados en el receptor NMDA, la magnitud del cambio observado en esta proteína es muy similar entre el cuerpo estriado derecho e izquierdo.

La densidad postsináptica (PSD, por sus siglas en inglés) es una fracción de membrana postsináptica especializada que contiene gran concentración de receptores NMDA y proteínas de señalización asociadas al citoesqueleto (Landis y col. 1974, Kennedy 1998). Esta densidad se encuentra en cercana aposición a terminales presinápticos, los cuales mayoritariamente son glutamatérgicos (Landis y col. 1974). PSD-95 es proteína constituyente de la densidad postsináptica y se une de manera directa a los receptores NMDA en diferentes estructuras del SNC (Kornau y col. 1995) e indirectamente vía la proteína estargazina al receptor AMPA (Chen y col 2000). Estudios *in vitro* de esta proteína han evidenciado que su sobreexpresión produce un aumento del tamaño y número de espinas dendríticas en neuronas hipocampales. Además, participa en la estabilización de espinas y formación de sinapsis (El-Husseini y col. 2000, Prange y Murphy 2001). Otros estudios realizados *in vivo* muestran una reducción en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas proyectivas estriatales en ratones mutantes que expresan una PSD-95 no funcional (Vickers y col. 2006). Contrariamente, los mismos autores encuentran un aumento en la densidad de espinas en células piramidales de hipocampo en los mismos ratones. Estos resultados se ven acompañados por

una reducción en los niveles de la subunidad NR1 y NR2B del NMDAR en estriado (Vickers y col. 2006). Este dato sugeriría que PSD-95 ejerce una función en la formación y mantenimiento de espinas pero no es esencial. Por otra parte, ciertas investigaciones en hipocampo han demostrado que la plasticidad sináptica a largo plazo (LTP) produce un rápido y local aumento en la formación de nuevas espinas en el sitio de estimulación (Engert y Bonhoeffer 1999), y este proceso es dependiente de la activación de los receptores NMDA. Previamente, también en hipocampo, se ha evidenciado un aumento de LTP en ratones mutantes de PSD-95. En este mismo trabajo se muestra que un estímulo de baja frecuencia (1 Hz) produjo un robusto LTP en esos mutantes (Migaud y col. 1998). Sugiriendo un menor umbral en el mecanismo molecular que desencadena la plasticidad y que puede promover el incremento en la formación de espinas en los ratones con PSD-95 mutada.

A partir de estos resultados controversiales descritos en estriado e hipocampo se puede argumentar que podría existir una relación entre el efecto de PSD-95 sobre la densidad de espinas y el tipo celular en el que éstas se expresan. Durante el desarrollo las espinas se forman y eliminan mientras las conexiones sinápticas se van consolidando. Cuando esta formación de espinas se realiza en ausencia de PSD-95 la cascada de señalización puede estar alterada y aunque la sinapsis se produzca, el proceso de estabilización funcional es anormal y podría implicar una reducción o elevación en la densidad de espinas. Claramente, el tamaño y morfología de las espinas dendríticas y el rearrreglo de moléculas de señalización dentro de las espinas se encuentran estrechamente regulados y son cruciales para el correcto procesamiento y almacenaje de la información neuronal. Evaluando estos antecedentes, la hipótesis II planteada en el apartado 4.2.1.1. sería la más plausible a ser considerada.

En cuerpo estriado se estudió el rol que cumple la proteína PSD-95 en la plasticidad. Específicamente los autores de este estudio utilizaron ratones mutantes para PSD-95 y observaron un aumento de LTP, como también un aumento de los efectos estimulantes del tratamiento agudo con cocaína pero se anula el incremento de la respuesta motora en el tratamiento crónico con esa droga (Yao y col. 2004). Sin embargo ni en ese trabajo ni en posteriores se

demuestra cómo son las corrientes de los receptores AMPA y NMDA en estos ratones genéticamente modificados, lo cual ayudaría a comprender la contribución de la transmisión sináptica basal y las vías de señalización para que se produzca el aumento de LTP observado.

Con respecto a la plasticidad por LTP, se sabe que PSD-95 puede regular el número de receptores AMPA sinápticos, y de este modo la transmisión basal (Schnell y col. 2002). Consistentemente, la sobreexpresión de PSD-95 aumenta los receptores AMPA, reprime el LTP y aumenta el LTD en corteza (Beique y Andrade 2003) e hipocampo (Stein y col. 2003).

Como anteriormente se mencionó, PSD-95 se une de manera directa al receptor NMDA (Kornau y col. 1995) y participa en el agrupamiento del receptor en la densidad postsináptica. Los resultados obtenidos en este trabajo podrían indicar que el aumento de actividad funcional provoca una reducción de receptores de forma tal de “preparar” el sistema ante esta nueva situación de actividad aumentada. En este contexto, la reducción también observada en la expresión de PSD-95 podría explicarse igualmente por un ajuste dependiente de actividad ante el nuevo nivel de receptores donde tal vez resultaría en exceso la cantidad normal de esa proteína ante los nuevos niveles del NMDAR. Se ha demostrado que PSD-95 modula la internalización del receptor NMDA que conduce al consecuente reciclado en los endosomas (Roche y col. 2001, Lavezzari y col. 2004). En este caso no se puede discriminar cuál evento ocurre primero o si es una conjunción de ambos. Ya sea la internalización y degradación del receptor y en consecuencia el ajuste de PSD-95, o un aumento de la internalización mediado por la proteína o que meramente el ajuste funcional se produce para los receptores pero debido a la asociación directa entre ambos, los niveles de PSD-95 también son afectados. Estas teorías podrían avalarse por un estudio que indica que el desacople de la interacción PSD-95/NMDA produce una disminución de un 20-30 % en la co-localización de ambas proteínas en la densidad postsináptica (Lim y col. 2003). Estos datos en conjunto podrían considerarse acordes con la hipótesis III del apartado 4.2.1.1. Sin embargo no son suficientes para la comprensión del mecanismo.

Además, puede considerarse que la reducción en los niveles de PSD-95 observada en cuerpo estriado podría reflejar una pérdida de sinapsis glutamatérgicas en esta región del cerebro por disminución de fibras corticoestriatales. Para evaluar esta posibilidad se estudió la expresión de la proteína presináptica Sinaptofisina (glicoproteína de vesícula sináptica) también mediante Western blot en la misma fracción subcelular que PSD-95. Los resultados aquí mostrados no evidencian cambios en los niveles de expresión de Sinaptofisina en ninguno de los grupos de animales entrenados respecto a sus controles. Este resultado podría considerarse como una primera aproximación que indica que las estructuras presinápticas permanecen intactas. La expresión de Sinaptofisina es ampliamente utilizada como marcador molecular presináptico. Una disminución en la inmunorreactividad de esta proteína ha sido interpretada como una disminución en los terminales presinápticos (Eastwood y col. 1994, Chen y col. 1995). Una evaluación más profunda podría incluir otros marcadores presinápticos como Sinapsina, Sintaxina y Neurofilamento (marcador axonal), (Yao y col. 2004). En diferentes trabajos se muestran resultados controversiales que establecen una relación entre la expresión de Sinaptofisina y la actividad motora. En hipocampo se demostró que el ejercicio produce un aumento en los niveles de Sinaptofisina (Vaynman y col. 2006) mientras que en cuerpo estriado se observó una disminución de la expresión de dicha proteína (Lambert y col. 2005). No obstante, aunque la expresión de Sinaptofisina se analice mayoritariamente como indicador de la densidad de terminales presinápticos, también debería considerarse que el número de vesículas por terminal podría estar variando y no la densidad de terminales.

4.2.7. Consideraciones biológicas y conclusiones finales

En el presente estudio se muestra la ontogenia del receptor NMDA durante el desarrollo del cuerpo estriado de rata y la adultez abarcando el período crítico estriatal de plasticidad motora previamente descrito. Los resultados presentados en este trabajo muestran un patrón de cambios en el número de receptores NMDA durante el desarrollo postnatal estriatal. La disminución en

la cuantía de receptores observada durante el desarrollo temprano (PN 24) podría explicarse por la disminución o “podado” de sinapsis asimétricas que se produce en el estriado de ratas entre el PN 18 y 25.

Congruentemente, se observan cambios en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B durante el desarrollo estriatal. El cambio en el patrón de expresión de las subunidades puede estar relacionado a la maduración funcional de las neuronas en el estriado ya que este receptor es expresado por todos los tipos neuronales estriatales. Es probable que no todos los genes de las subunidades del NMDAR estén expresados igualmente desde el nacimiento ya que el cambio observado durante el desarrollo es diferente para cada subunidad. Variaciones en la composición de las subunidades del receptor NMDA forman parte de la base molecular para la plasticidad de los períodos críticos.

También en este estudio se evaluó el efecto de la estimulación motora sobre los receptores NMDA. La actividad funcional realizada en el TEC produjo una reducción permanente en la cuantía de receptores NMDA y en la expresión de sus subunidades, como también en la expresión de la proteína PSD-95. Ya que los cambios observados sólo lograron ser desencadenados cuando el entrenamiento motor se llevó a cabo durante las edades PN 20-27 este período puede ser considerado de máxima plasticidad para el sistema glutamatérgico estriatal. La existencia de esta plasticidad durante el desarrollo otorga al sistema la ventaja evolutiva de “adaptarse”, refinar su estructura en función de los estímulos, en este caso, la actividad motora. A partir de esta consideración, es válido establecer una correlación con la definición de período crítico de Hubel y Wiesel. En esta etapa de máxima plasticidad correspondiente a un período específico del desarrollo postnatal temprano se pueden generar cambios permanentes en la capacidad funcional del SNC.

El período crítico estriatal del sistema colinérgico-dopaminérgico ha sido establecido durante los días PN 30-37, durante esta etapa cambios en el sistema glutamatérgico no fueron observados. Por lo cual el período de sensibilidad del sistema glutamatérgico podría considerarse como un pre-período crítico en el cual la actividad motora es capaz de modificar el patrón

sináptico de conectividad del sistema. Estos datos permitirían profundizar el estudio de los mecanismos que regulan la neurotransmisión estriatal interpretando la interacción colinérgica, dopaminérgica y glutamatérgica durante el desarrollo.

El conjunto de todos los resultados obtenidos permiten establecer las siguientes conclusiones finales:

- ✿ Durante el desarrollo postnatal se produce un cambio dinámico y diferencial en la expresión genética de las subunidades del receptor NMDA. Este cambio contribuye al patrón de maduración de los receptores NMDA funcionales.
- ✿ La reducción observada al PN 24 en los receptores NMDA se corresponde con el podado de sinapsis asimétricas del cuerpo estriado.
- ✿ La actividad motora funcional ejercida exclusivamente durante los días PN 20-27 produce una reducción permanente de los receptores NMDA y de la expresión de sus subunidades. Este período corresponde a una etapa ontogenética de plasticidad sináptica dependiente de actividad para el ajuste permanente de sinapsis excitatorias.
- ✿ Este estudio permite completar la descripción de la maduración funcional del cuerpo estriado estableciendo la existencia de dos períodos diferentes de plasticidad sináptica dependiente de actividad. Uno para las sinapsis excitatorias y otro para las sinapsis modulatorias.

Lic. Mariana Fossati
Autora

Dr. Julio Marcos Azcurra
Director

REFERENCIAS

5. REFERENCIAS

- Akopian G, Walsh JP. 2006. Pre- and postsynaptic contributions to age-related alterations in corticostriatal synaptic plasticity. *Synapse*. 60:223-238.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 12:366-375.
- Alexander GE, Crutcher ME. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*. 13:266-271.
- Aosaki T, Graybiel AM, Kimura M. 1994. Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science*. 265:412-415.
- Arbuthnott GW, Crow TJ. 1971. Relation of contraversive turning to unilateral release of dopamine from the nigrostriatal pathway in rats. *Exp. Neurol*. 30:484-491.
- Arbuthnott GW, Ingham CA, Wickens JR. 1998. Modulation by dopamine of rat corticostriatal input. *Adv. Pharmacol*. 42:733-736.
- Aronin N, DiFiglia M, Graveland GA, Schwartz WJ, Wu JY. 1984. Localization of immunoreactive enkephalins in GABA synthesizing neurons of the rat neostriatum. *Brain Res*. 300:376-380.
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K. 1997. Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 10:6496-6499.
- Aubert I, Cecyry D, Gauthier S, Quirion R. 1996. Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J. Comp. Neurol*. 369:31-55.
- Azcurra JM, De Robertis E. 1967. Binding of dimethyl-C14-d-Tubocurarine, methyl-C14-heptamethonium and H3-Alloferine by isolated synaptic membranes of brain cortex. *Int. J. Neuropharmacol* 6:15-26.
- Azcurra JM, Soiza-Reilly M, Fossati M, Paratcha GC. 2003. Delayed and bilateral changes of GAP-43/B-50 phosphorylation after circling training during a critical period in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 118:166-170.
- Baldessarini RJ, Tarsy D. 1980. Dopamine and the pathophysiology of dyskinesias induced by antipsychotic drugs. *Ann. Rev. Neurosci*. 3:23-41.
- Banks MS, Aslin RN, Letson RD. 1975. Sensitive period for the development of human binocular vision. *Science* 190:675-677.
- Barbeau A, Mars H, Gillo-Joffroy L. 1971. Adverse clinical side effects of levodopa therapy. *Contemp. Neurol. Ser*. 8:203-237.

- Barnes CA. 1979. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93:74-104.
- Barnes T, Kubota Y, Hu D, Jin DZ, Graybiel AM. 2005. Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature.* 437:1158-1161.
- Baudry M, Arst D, Oliver M, Lynch G. 1981. Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. *Brain Res.* 227:37-48.
- Baunez C, Nieoullon A, Amalric M. 1994. N-methyl-D-aspartate receptor blockade impairs behavioural performance of rats in a reaction time task: new evidence for glutamatergic-dopaminergic interactions in the striatum. *Neuroscience.* 61:521-531.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature.* 321:168-171.
- Bear MF, Kleinschmidt A, Gu QA, Singer W. 1990. Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* 10:909-925.
- Bear MF, Malenka RC. 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Op. Neurobiol.* 4:389-399.
- Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL. 1999. Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J. Neurosci.* 19:4449-4461.
- Beique JC, Andrade R. 2003. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *J. Physiol.* 546:859-867.
- Benke D, Wenzel A, Scheuer L, Fritschy JM, Mohler H. 1995. Immunobiochemical characterization of the NMDA-receptor subunit NR1 in the developing and adult rat brain. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 15:393-411.
- Bennett EL, Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR. 1964. Chemical and anatomical plasticity of brain. *Science* 146:610-619.
- Berardi N, Maffei L. 1999. From visual experience to visual function: roles of neurotrophins. *J. Neurobiol.* 41:119-126.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. 2000. Critical periods during sensory development. *Curr. Op. Neurobiol.* 10:138-144.
- Bernard V, Bolam JP. 1998. Subcellular and subsynaptic distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the neostriatum and globus pallidus of the rat: co-localization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. *Eur. J. Neurosci.* 10:3721-3736.
- Blandini F, Greenamyre JT, Nappi G. 1996. The role of glutamate in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Funct. Neurol.* 11:3-15.

- Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361:31-39.
- Blomquist KB, Danner F. 1987. Effects of physical conditioning on information-processing efficiency. *Percept. Mot. Skills.* 65:175-186.
- Bouyer JJ, Park DH, Joh TH, Pickel VM. 1984. Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res.* 302:267-275.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.
- Brandon EP, Lin W, D'Amour KA, Pizzo DP, Domínguez B, Sugiura Y, Thode S, Ko CP, Thal LJ, Gage FH, Lee KF. 2003. Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J. Neurosci.* 23:539-549.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347:768-770.
- Brusés JL, Berninsone PM, Ojea SI, Azcurra JM. 1991. The circling training rat model as a behavioral teratology test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38:739-745.
- Brusés JL, Azcurra JM. 1993. The circling training: A behavioral paradigm for functional teratology testing. *Meth Neurosci* 14:166-179.
- Buffelli M, Burgess RW, Feng G, Lobe CG, Lichtman JW, Sanes JR. 2003. Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature* 424:430-434.
- Buonomano DV, Merzenich MM. 1998. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu. Rev. Neurosci.* 21:149-186.
- Butler AK, Uryu K, Chesselet MF. 1998. A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *Dev. Neurosci.* 20:253-262.
- Butler AK, Uryu K, Rougon G, Chesselet MF. 1999. N-methyl-D-aspartate receptor blockade affects polysialylated neural cell adhesion molecule expression and synaptic density during striatal development. *Neuroscience.* 89:1169-1181.
- Butters N, Salmon DP, Heindel WC. 1994. Specificity of the memory deficits associated with basal ganglia dysfunction. *Rev. Neurol. (Paris).* 150:580-587.
- Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. 1992 (a). Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J. Neurosci.* 12:4224-4233.

- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. 1992 (b). Long-term potentiation in the striatum is unmasked by removing the voltage-dependent magnesium block of NMDA receptor channels. *Eur. J. Neurosci.* 4:929-935.
- Calabresi P, Maj R, Mercuri NB, Bernardi G. 1992 (c). Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neurosci. Lett.* 142:95-99.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. 1994. Post-receptor mechanisms underlying striatal long-term depression. *J. Neurosci.* 14:4871-4881.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. 1996. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 19:19-24.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G. 2000. Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *TINS* 23:120-126.
- Carey RJ, Dai H, Gui J. 1998. Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. *Psychopharmacology.* 137:241-246.
- Carlsson M, Carlsson A. 1990. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia, implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 13:272-276.
- Catalano SM, Chang CK, Shatz CJ. 1997. Activity-dependent regulation of NMDAR1 immunoreactivity in the developing visual cortex. *J. Neurosci.* 17:8376-8390.
- Centonze D, Rossi S, De Bartolo P, De Chiara V, Foti F, Musella A, Mataluni G, Rossi S, Bernardi G, Koch G, Petrosini L. 2008. Adaptations of glutamatergic synapses in the striatum contribute to recovery from cerebellar damage. *Eur. J. Neurosci.* 27:2188-2196.
- Ceresoli G, Fuller MS, Schwarcz R. 1996. Excitotoxic lesions of the rat striatum: different responses of kynurenine pathway enzymes during ontogeny. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 92:61-69.
- Charpier S, Deniau JM. 1997. In vivo activity-dependent plasticity at corticostriatal connections: evidence for physiological long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 94:7036-7040.
- Chen KS, Masliah E, Mallory M, Gage FH. 1995. Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience.* 68:19-27.
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA. 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature.* 408:936-943.
- Chen L, Cooper NG, Mower GD. 2000. Developmental changes in the expression of NMDA receptor subunits (NR1, NR2A, NR2B) in the cat visual cortex and the effects of dark rearing. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 78:196-200.
- Chen Q, Reiner A. 1996. Cellular distribution of the NMDA receptor NR2A/2B subunits in the rat striatum. *Brain Res.* 743:346-352.

- Chen Q, Veenman CL, Reiner A. 1996. Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits on specific striatal neuron types and its implication for striatal vulnerability in glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *Neuroscience*. 73:715-731.
- Chesselet MF, Delfis JM. 1996. Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci*. 19:417-422.
- Christie JE, Crow TJ. 1971. Turning behaviour as an index of the action of amphetamines and ephedrine on central dopamine-containing neurons. *Br. J. Pharmacol*. 43:658-667.
- Clark S, Stashett S, Lewis D, Martin D, Wilson WA. 1994. The NMDA receptor in epilepsy. En: The NMDA receptor. Oxford: *Oxford University Press*, 395-427.
- Clarkson-Smith L, Hartley AA. 1989. Relationships between physical exercise and cognitive abilities in older adults. *Psychol. Aging*. 4:183-189.
- Colman H, Nabekura J, Lichtman JW. 1997. Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science*. 275:356-361.
- Colwell CS, Cepeda C, Crawford C, Levine MS. 1998. Postnatal development of glutamate receptor-mediated responses in the neostriatum. *Dev. Neurosci*. 20:154-163.
- Cools AR, van den Bercken JH, Horstink MW, van Spaendonck KP, Berger HJ. 1981. The basal ganglia and the control of movement: the basal ganglia and the programming of behaviour. *Trends Neurosci*. 4:124.
- Cotman CW, Nieto-Sampedro M, Harris EW. 1981. Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. *Physiol. Rev*. 61:684-784.
- Cotman CW, Nieto-Sampedro M. 1984. Cell biology of synaptic plasticity. *Science* 225:1287-1294.
- Cowan CJ, Fawcett JA, O'Leary DDM, Stanfield BB. 1984. Regressive events in neurogenesis. *Science* 225:1258-1265.
- Coyle JT, Campochiaro P. 1976. Ontogenesis of dopaminergic-cholinergic interactions in the rat striatum. A neurochemical study. *J. Neurochem* 27:673-678.
- Coyle JT, Yamamura HI. 1976. Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res*. 118:429-440.
- Cramer KS, Sur M. Activity-dependent remodeling of connections in the mammalian visual system. *Curr Op Neurobiol* 5:106-111, 1995.
- Crepel F. 1982. Regression of functional synapses in the immature mammalian cerebellum. *Trends Neurosci*. 5:266-269.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. 1959. Chemical excitation of spinal neurones. *Nature*. 183:611-612.
- Das GD, Altman J. 1970. Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat brain. *Brain Res* 21:122-127.

- Davies J, Francis AA, Jones AW, Watkins JC. 1981. 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci. Lett.* 21:77-81.
- Daw NW, Gordon B, Fox KD, Flavin HJ, Kirsch JD, Beaver CJ, Ji Q, Reid SN, Czepita D. 1999. Injection of MK-801 affects ocular dominance shifts more than visual activity. *J. Neurophysiol.* 81:204-215.
- DeLong MR. 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13:281-285.
- Di Chiara G, Morelli M, Consolo S. 1994. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci.* 17:228-233.
- Diamond J, Holmes M, Coughlin M. 1992. Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. *J. Neurosci.* 12:1454-1466.
- Diana M, García-Muñoz M, Richards J, Freed CR. 1989. Electrophysiological analysis of dopamine cells from the substantia nigra pars compacta of circling rats. *Exp. Brain. Res.* 74:625-630.
- DiFiglia M, Pasik P, Pasik T. 1976. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 114:245-256.
- Dityatev A, Schachner M. 2003. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:456-468.
- Divac I, Morkowitsch HJ, Pritzel M. 1978. Behavioral and anatomical consequences of small intrastriatal injections of kainic acid in the rat. *Brain Res.* 151:523-532.
- Domenici L, Cellerino A, Berardi N, Cattaneo A, Maffei L. 1994. Antibodies to nerve growth factor (NGF) prolong the sensitive period for monocular deprivation in the rat. *Neuroreport* 5:2041-2044.
- Doupe AJ, Jul PK. 1999. Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:567-631.
- Doyère V, Rédini-Del Negro C, Dutrieux G, Le Floch G, Davis S, Laroche S. 1995. Potentiation or depression of synaptic efficacy in the dentate gyrus is determined by the relationship between the conditioned and unconditioned stimulus in a classical conditioning paradigm in rats. *Behav. Brain Res.* 70:15-29.
- Drukarch B, Schepens B, Stoof JC. 1990. Muscarinic receptor activation attenuates D2 dopamine receptor mediated inhibition of acetylcholine release in rat striatum: indications for a common signal transduction pathway. *Neurosci.* 37:1-9.
- Dudai Y. 1989. The neurobiology of memory. *Trends, Oxford University Press.*
- Dunbar GL, Lescaudron LL, Stein DG. 1993. 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.

- Dustman RE, Emmerson RY, Ruhling RO, Shearer DE, Steinhaus LA, Johnson SC, Bonekat HW, Shigeoka JW. 1990. Age and fitness effects on EEG, ERPs, visual sensitivity, and cognition. *Neurobiol. Aging*. 11:193-200.
- Eastwood SL, Burnet PW, McDonald B, Clinton J, Harrison PJ. 1994. Synaptophysin gene expression in human brain: a quantitative in situ hybridization and immunocytochemical study. *Neuroscience*. 59:881-892.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. 2000. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*. 290:1364-1368.
- Emmerson RY, Dustman RE, Shearer DE, Turner CW. 1989. P3 latency and symbol digit performance correlations in aging. *Exp. Aging Res.* Autumn-Winter. 15:151-159.
- Engert F, Bonhoeffer T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 399:66-70.
- Erdö SL, Wolff JR. 1990. Postnatal development of the excitatory amino acid system in visual cortex of the rat. Changes in ligand binding to NMDA, quisqualate and kainate receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8:199-204.
- Erisir A, Harris JL. 2003. Decline of the critical period of visual plasticity is concurrent with the reduction of NR2B subunit of the synaptic NMDA receptor in layer 4. *J. Neurosci.* 23:5208-5218.
- Facchinetti F, Ciani E, Dall'Olio R, Virgili M, Contestabile A, Fonnum F. 1993. Structural, neurochemical and behavioural consequences of neonatal blockade of NMDA receptor through chronic treatment with CGP 39551 or MK-801. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 74:219-224.
- Fagiolini M, Pizzorusso T, Bernardi N, Domenici L, Maffei L. 1986. Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. *Science*. 232:235-238.
- Fagiolini M, Hensch TK. 2000. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature*. 404:183-186.
- Fagiolini M, Fritschy JM, Low K, Mohler H, Rudolph U, Hensch TK. 2004. Specific GABAA circuits for visual cortical plasticity. *Science*. 303:1681-1683.
- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J. 2000. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci.* 23:80-88.
- Farrant M, Cull-Candy SG. 1991. Excitatory amino acid receptor-channels in Purkinje cells in thin cerebellar slices. *Proc. Biol. Sci.* 244:179-184.
- Feldman DE, Brainard MS, Knudsen EI. 1996. Newly learned auditory responses mediated by NMDA receptors in the owl inferior colliculus. *Science*. 271:525-528.
- Feller MB, Scanziani M. 2005. A precritical period for plasticity in visual cortex. *Curr. Op. Neurobiol.* 15:94-100.
- Fordyce DE, Farrar RP. 1991. Physical activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial learning in F344 rats. *Behav. Brain Res.* 43:115-123.

- Fordyce DE, Starnes JW, Farrar RP. 1991. Compensation of the age-related decline in hippocampal muscarinic receptor density through daily exercise or underfeeding. *J. Gerontol.* 46:B245-248.
- Franck E. 1987. The influence of neuronal activity on patterns of synaptic connections. *TINS.* 10:188-190.
- Franks KM, Isaacson JS. 2005. Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. *Neuron.* 47:101-114.
- Freund TF, Powell JF, Smith AD. 1984. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience.* 13:1189-1215.
- Garcia R, Jaffard R. 1993. A comparative study of age-related changes in inhibitory processes and long-term potentiation in the lateral septum of mice. *Brain Res.* 620:229-236.
- García-Muñoz M, Patino P, Masliah E, Young SJ, Groves PM. 1996. Glutamate-dependent long-term presynaptic changes in corticostriatal excitability. *Neuroscience.* 73:109-119.
- Garraghty PE, Sur M. 1993. Competitive interactions influencing the development of retinal axonal arbors in cat lateral geniculate nucleus *Physiol. Rev.* 73:529-545
- Gasic GP, Hollmann M. 1992. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 54:507-536.
- Gerfen CR. 1985. The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J. Comp. Neurol.* 236:454-476.
- Gerfen CR, Young WS. 1988. Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res.* 460:161-167.
- Gerfen CR. 1989. The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science.* 246:385-388.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR. 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 250:1429-1432.
- Gerfen CR. 1992 (a). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 15:133-139.
- Gerfen CR. 1992 (b). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* 15:285-320.
- Gerfen CR, Wilson CJ. 1996. The basal ganglia. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 12: Integrated systems of the CNS. Part III (eds. Björklund A, Hökfelt T, Swanson L) 369-466. Elsevier Science, Amsterdam.

- Geyer MA. 1990. Approaches to the characterization of drug effects on locomotor activity in rodents. Testing and evaluation of drugs of abuse. Modern methods in Pharmacology 6:81-99. Willey-Liss, Inc.
- Gilliam PE, Spirduso WW, Martin TP, Walters TJ, Wilcox RE, Farrar RP. 1984. The effects of exercise training on [3H]-spiperone binding in rat striatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20:863-867.
- Glazewski S, Kossut M, Siucinska E, Skangiel-Kramska J. 1990. Cholinergic markers in the plasticity of murine barrel field. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 50:163-172.
- Gleser J, Mendelberg H. 1990. Exercise and sport in mental health: a review of the literature. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 27:99-112.
- Glick SD, Jerussi TP, Fleisher LN. 1976. Turning in circles: the neuropharmacology of rotation. *Life Sci.* 18:889-896.
- Glick SD, Cox RD. 1978. Nocturnal rotation in normal rats: correlation with amphetamine-induced rotation and effects of nigrostriatal lesions. *Brain Res.* 150:149-161.
- Goldin M, Segal M, Avignone E. 2001. Functional plasticity triggers formation and pruning of dendritic spines in cultured hippocampal networks. *J. Neurosci.* 21:186-193.
- Goodman CS, Shatz CJ. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell.* 72:77-98.
- Götz T, Kraushaar U, Geiger J, Lubke J, Berger T, Jonas P. 1997. Functional properties of AMPA and NMDA receptors expressed in identified types of basal ganglia neurons. *J. Neurosci.* 17:204-215.
- Granholm E, Bartzokis G, Asarnow RF, Marder SR. 1993. Preliminary associations between motor procedural learning, basal ganglia T2 relaxation times, and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 50:33-44.
- Graveland GA, Diiglia M. 1985. The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. 1985. *Brain Res.* 327:307-311.
- Graybiel AM, Ragsdale CW Jr. 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:5723-5726.
- Graybiel AM. 1990. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 13:244-254.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA. 1990. 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. USA.* 87:6912-6916.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science.* 265:1826-1831.
- Graybiel AM. 2005. The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr. Op. Neurobiol.* 15:638-644.

- Greene JG, Greenamyre JT. 1996. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. Neurobiol.* 48:613-634.
- Greene JG, Sheu SS, Gross RA, Greenamyre JT. 1998. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience.* 84:503-510.
- Greif KF, Tillakaratne NJ, Erlander MG, Feldblum S, Tobin AJ. 1992. Transient increase in expression of a glutamate decarboxylase (GAD) mRNA during the postnatal development of the rat striatum. *Dev. Biol.* 153:158-164.
- Gubellini P, Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P. 2004. Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Prog. Neurobiol.* 74:271-300.
- Gwag BJ, Springer JE. 1993. Activation of NMDA receptors increases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the hippocampal formation. *Neuroreport.* 5:125-128.
- Hanover JL, Huang JZ, Tonegawa S, Stryker MP. 1999. Brain-derived neurotrophic factor overexpression induces precocious critical period in mouse visual cortex. *J. Neurosci.* 19:1-5.
- Harwerth RS, Smith EL, Duncan GC, Crawford ML, Von Noorden GK. 1986. Multiple sensitive periods in the development of the primate visual system. *Science.* 232:235-238.
- Hashimoto K, Kano M. 2003. Functional differentiation of multiple climbing fiber inputs during synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron.* 38:785-796.
- Hattori T, McGeer PL. 1973. Synaptogenesis in the corpus striatum of infant rat. *Exp. Neurol.* 38:70-79.
- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. 1980. Partial Lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res.* 195:123-137.
- Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF. 1998. Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science.* 282:1504-1508.
- Hensch TK. 2004. Critical period regulation. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:549-579.
- Hensch TK. 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:877-888.
- Hensch TK, Fagiolini M. 2005. Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Prog. Brain Res.* 147:115-124.
- Hickmott PW, Constantine-Paton M. 1997. Experimental down-regulation of the NMDA channel associated with synapse pruning. *J. Neurophysiol.* 78:1096-1107.
- Hikosaka O, Wurtz RH. 1983. Visual and oculomotor functions of monkey substantia nigra pars reticulata. III. Memory-contingent visual and saccade responses. *J. Neurophysiol.* 49:1268-1284.

- Hockfield S, Kalb RG, Zaremba S, Fryer H. 1990. Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55:505-514.
- Hokfelt T, Ljungdhal T, Terenius L, Elde R, Nilsson G. 1977. Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 74:3081-3085.
- Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neuroscience.* 17:31-108.
- Hollmann M, Maron C, Heinemann S. 1994. N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron.* 13:1331-1343.
- Hoover DB, Muth EA, Jacobowitz DM. 1978. A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. *Brain Res.* 153:295-306.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S. 1999. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell.* 98:739-755.
- Hubel DH and Wiesel TN. 1962. Receptive fields binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol. Lond.* 160:106-154.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1965. Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J. Neurophysiol.* 28:1041-1059.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1968. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J. Physiol.* 195:215-243.
- Hubel DH and Wiesel TN. 1998. Early exploration of the visual cortex. *Neuron.* 20:401-412.
- Huntley GW. 1997. Differential effects of abnormal tactile experience on shaping representation patterns in developing an adult motor cortex. *J. Neurosci.* 17:9220-9232.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG. 2000. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.* 3:661-669.
- Husi H, Grant SG. 2001. Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J. Neurochem.* 77:281-291.
- Ibarra GR, Rodriguez JA, Paratcha GC, Azcurra JM. 1995. Permanent alteration of muscarinic acetylcholine receptor binding in rat striatum after circling training during development. *Brain Res.* 705:39-44.
- Ibarra GR, Paratcha GC, Wolansky MJ, Azcurra JM. 1996. Co-alteration of dopamine D2 receptor and muscarinic acetylcholine receptor binding in rat striatum after circling training. *Neuroreport.* 7:2491-2494.

- Ibarra GR. 1997. Demostración de un período crítico de plasticidad nerviosa durante el desarrollo postnatal del cuerpo estriado de rata. Tesis Doctoral en Biología. UBA.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW. 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 283:70-74.
- Insel TR, Miller LP, Gelhard RE. 1990. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain--I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*. 35:31-43.
- Ishii S, Yoshida W, Yoshimoto J. 2002. Control of exploitation-exploration meta-parameter in reinforcement learning. *Neural Netw*. 15:665-687.
- Jacobson M (Ed). Developmental neurobiology. 2nd edition. Plenum Press, New York, 1978.
- Jane DE, Olverman HJ, Watkins JC. 1994. Agonists and competitive antagonists: structure activity and molecular modelling. En: The NMDA receptor. Oxford: *Oxford University Press*, 31-104.
- Kaas JH, Merzenich MM, Killackey HP. 1983. The reorganization of somatosensory cortex following peripheral nerve damage in adult and developing mammals. *Annu. Rev. Neurosci*. 6:325-356.
- Kakizawa S, Yamasaki M, Watanabe M, Kano M. 2001. Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum. *J. Neurosci*. 20:4954-4961.
- Kao MH, Doupe AJ, Brainard MS. 2005. Contributions of an avian basal ganglia-forebrain circuit to real-time modulation of song. *Nature*. 433:638-643.
- Katz LC, Shatz CJ. 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*. 274:1133-1138.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC. 1990. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci*. 10:3421-3438.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*. 18:527-535.
- Kemp JM, Powell TP. 1970. The cortico-striate projection in the monkey. *Brain* 93:525-546.
- Kennedy MB. 1998. Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane. *Brain Res. Rev*. 26:243-257.
- Kerns JM, Sierens DK, Kao LC, Klawans HL, Carvey PM. 1992. Synaptic plasticity in the rat striatum following chronic haloperidol treatment. *Clin. Neuropharmacol*. 15:488-500.
- Kesner RP, Bolland BL, Dakis M. 1993. Memory for spatial locations, motor responses, and objects: triple dissociation among the hippocampus, caudate nucleus, and extrastriate visual cortex. *Exp. Brain Res*. 93:462-470.

- King AJ, Moore DR. 1991. Plasticity of auditory maps in the brain. *TINS*. 14:31-37.
- Kinnier Wilson SA. 1928. *Modern Problems in Neurology*. Ed. Edward Arnold & Co. London.
- Kitai ST, Surmeier DJ. 1993. Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv. Neurol.* 60:40-52.
- Klinzova AJ, Uranova NA, Haselhorst U, Schenk H. 1990. Synaptic plasticity in rat medial prefrontal cortex under chronic haloperidol treatment produced behavioral sensitization. *J. Hirnforsch.* 31:175-179.
- Klose M, Bentley D. 1989. Transient pioneer neurons are essential for formation of an embryonic peripheral nerve. *Science*. 245: 982-983.
- Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. 1996. A neostriatal habit learning system in humans. *Science*. 273:1399-1402.
- Komuro H, Rakic P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*. 260:95-97.
- Konradi C, Cole RL, Heckers S, Hyman SE. 1994. Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *J. Neurosci.* 14:5623-5634.
- Koob GF. 1992. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:177-184.
- Koob GF. 1992. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:177-184.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburgh PH. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*. 269:1737-1740.
- Küppenbender KD, Albers DS, Iadarola MJ, Landwehrmeyer GB, Standaert DG. 1999. Localization of alternatively spliced NMDAR1 glutamate receptor isoforms in rat striatal neurons. *J. Comp. Neurol.* 415:204-217.
- Küppenbender KD, Standaert DG, Feuerstein TJ, Penney JB Jr, Young AB, Landwehrmeyer GB. 2000. Expression of NMDA receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 419:407-421.
- Kumar A, Schliebs R, Bigl V. 1994. Postnatal development of NMDA, AMPA, and kainate receptors in individual layers of rat visual cortex and the effect of monocular deprivation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12:31-41.
- Lai SK, Wong CK, Yang MS, Yung KK. 2000. Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the rat neostriatum after a single dose of antisense oligonucleotide specific for N-methyl-D-aspartate receptor 1 subunit. *Neuroscience*. 98:493-500.
- Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. 2005. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 83:206-216.

- Land PW, Simons DJ. 1985. Cytochrome oxidase staining in the rat Sml barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* 238:225-235.
- Landis DM, Reese TS, Raviola E. 1974. Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory components of the reciprocal synapse in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 155:67-91.
- Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Testa CM, Penney JB Jr., Young AB. 1995. NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J. Neurosci.* 15:5297-5307.
- Lau WK, Lui PW, Wong CKC, Chan YS, Yung KKL. 2003. Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger ribonucleic acids and immunoreactivity in the rat neostriatum during postnatal development. *Neurochem. Int.* 43:47-65.
- Lauder JM, Bloom FE. 1974. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* 155:469-483.
- Lauder JM., Bloom FE. 1975. Ontogeny of monoamine neurons. II. Synaptogenesis. *J. Comp. Neurol.* 163:251-264.
- Lavezzari G, McCallum J, Dewey CM, Roche KW. 2004. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J. Neurosci.* 24:6383-6391.
- Le Moine C, Normand E, Bloch B. 1991. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:4205-4209.
- Le Moine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R, Bloch B. 1990. Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:230-234.
- Le Vay S, Wiesel TN, Hubel DH. 1972. Laminar and columnar distribution of geniculocortical fibers in the macaque-monkey. *J. Comp. Neurol.* 146:421-450.
- Lehmann J, Langer SZ. 1983. The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals? *Neurosci.* 10:1105-1120.
- Lenn NJ. 1987. Neuroplasticity and the developing brain: implications for therapy. *Pediatr. Neurosci.* 13:176-183.
- Lessard N, Pare M, Lepore F, Lassonde M. 1998. Early-blind human subjects localize sound sources better than sighted subjects. *Nature.* 395:278-280.
- Lichtman JW, Colman H. 2000. Synapse elimination and indelible memory. *Neuron.* 25:269-278.
- Lim IA, Merrill MA, Chen Y, Hell JW. 2003. Disruption of the NMDA receptor-PSD-95 interaction in hippocampal neurons with no obvious physiological short-term effect. *Neuropharmacology.* 45:738-754.
- Lipton SA, Kater SB. 1989. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *TINS.* 12:265-270.

- Liu G. 2004. Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat. Neurosci.* 7:373-379.
- Liu J, Nickolenko J, Sharp FR. 1994. 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.
- Livingston FS, Mooney R. 1997. Development of intrinsic and synaptic properties in a forebrain nucleus essential to avian song learning. *J. Neurosci.* 17:8997-9009.
- Long MA, Cruikshank SJ, Jutras MJ, Connors BW. 2005. Abrupt maturation of a spike-synchronizing mechanism in neocortex. *J. Neurosci.* 25:7309-7316.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193:265-275.
- Lupinacci NS, Rikli RE, Jones CJ, Ross D. 1993. Age and physical activity effects on reaction time and digit symbol substitution performance in cognitively active adults. *Res. Q. Exerc. Sport.* 64:144-150.
- MacRae PG, Spirduso WW, Cartee GD, Farrar RP, Wilcox RE. 1987. Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolite levels. *Neurosci. Lett.* 79:138-144.
- Magnusson KR, Cotman CW. 1993. Effects of aging on NMDA and MK801 binding sites in mice. *Brain Res.* 604:334-337.
- Marsden CD. 1980. The enigma of the basal ganglia and movement. *Trends Neurosci.* 3:284-287.
- Marsden CD. 1981. The basal ganglia and the control of movement: motor activity and the outputs of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 4:124-125.
- Mataga N, Imamura K, Shiomitsu T, Yoshimura Y, Fukamauchi K, Watanabe Y. 1996. Enhancement of mRNA expression of tissue-type plasminogen activator by L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine in association with ocular dominance plasticity. *Neurosci. Lett.* 218:149-152.
- Mataga N, Nagai N, Hensch TK. 2002. Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:7717-7721.
- Matsuoka I, Suzuki Y, Defer N, Nakanishi H, Hanoune J. 1997. Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *J. Neurochem.* 68:498-506.
- Mayer ML, Westbrook GL. 1987. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 28:197-276.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Ann. Rev. Neurosci.* 22:295-318.
- McDonald RJ, White NM. 1993. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav. Neurosci.* 107:3-22.
- McDonald RJ, White NM. 1994. Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav. Neural Biol.* 61:260-270.

- Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M. 1992. Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature*. 357:70-74.
- Mele A, Castellano C, Felici A, Cabib S, Caccia S, Oliverio A. 1996. Dopamine-N-methyl-D-aspartate interactions in the modulation of locomotor activity and memory consolidation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 308:1-12.
- 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*. 1983 Nov;10(3):639-65.
- Merzenich MM, Nelson RJ, Stryker MP, Cynader MS, Schoppmann A, Zook JM. 1984. Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J. Comp. Neurol.* 224:591-605.
- Michaelis EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54:369-415.
- Michaelis EK. 1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54:369-415.
- Micheva KD, Beaulieu C. 1995. An anatomical substrate for experience-dependent plasticity of the rat barrel field cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:11834-11838.
- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watanabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG. 1998. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*. 396:433-439.
- Miller JC, Friedhoff AJ. 1986. Prenatal neuroleptic exposure alters postnatal striatal cholinergic activity in the rat. *Dev. Neurosci.* 8:111-116.
- Miller JC, Friedhoff AJ. 1988. Prenatal neurotransmitter programming of postnatal receptor function. *Prog. Brain Res.* 73:509-522.
- Mishkin M, Malamut B, Bachevalier J. 1984. Memories and habits. *Neurobiology of learning and memory*. Pg 65-77. Lynch G, McGaugh JL, Weinberger NM (eds.). Guilford, New York.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 12:529-540.
- Moratalla R, Vickers EA, Robertson HA, Cochran BH, Graybiel AM. 1993. Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. *J. Neurosci.* 13:423-433.
- Morgan ME, Yamamoto BK, Freed CR. 1984. Unilateral activation of caudate tyrosine hydroxylase during voluntary circling behavior. *J. Neurochem.* 43:737-741.

- Morin AM, Hattori H, Wasterlain CG, Thomson D. 1989. [3H]MK-801 binding sites in neonate rat brain. *Brain Res.* 487:376-379.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* 354:31-37.
- Mower GD, Chen L. 2003. Laminar distribution of NMDA receptor subunit (NR1, NR2A, NR2B) expression during the critical period in cat visual cortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 119:19-27.
- Muller CM, Griesinger CB. 1998. Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 1:47-53.
- Munson PJ, Rodbard D. 1980. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* 107:220-239.
- Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 258:597-603.
- Nakanishi S. 1994. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron.* 13:1031-1037.
- Nakanishi S, Masu M. 1994. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:319-348.
- Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Ankara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M. 1998. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26:230-235.
- Nansen EA, Jokel ES, Lobo MK, Micevych PE, Ariano MA, Levine MS. 2000. Striatal ionotropic glutamate receptor ontogeny in the rat. *Dev. Neurosci.* 22:329-340.
- Nase G, Weishaupt J, Stern P, Singer W, Monyer H. 1999. Genetic and epigenetic regulation of NMDA receptor expression in the rat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.* 11:4320-4326.
- Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. 1995 Exercise and brain neurotrophins. *Nature.* 373:109.
- Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 726:49-56.
- Nestler EJ. 1992. Molecular mechanisms of drug addiction. *J. Neurosci.* 12:2439-2450.
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL. 1993. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron.* 11:995-1006.
- Neville HJ, Lawson D. 1987. Attention to central and peripheral visual space in a movement detection task: an event-related potential and behavioral study. Congenitally deaf adults. *Brain Res.* 405:268:283.
- Nicholson LF, Faull RL, Waldvogel HJ, Dragunow M. 1995. GABA and GABAA receptor changes in the substantia nigra of the rat following quinolinic acid

- lesions in the striatum closely resemble Huntington's disease. *Neuroscience*. 66:507-521.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M. 1996. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci*. 16:2157-2163.
- Nisenbaum LK, Webster SM, Chang SL, McQueeney KD, LoTurco JJ. 1998. Early patterning of prelimbic cortical axons to the striatal patch compartment in the neonatal mouse. *Dev. Neurosci*. 20:113-124.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 307:462-465.
- Oberg RGE, Divac I. 1981. The basal and the control of movement: levels of motor planning. Cognition and the control of movement. *Trends Neurosci*. 4:122-124.
- Oertel WH, Mugnaini E. 1984. Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci. Lett*. 47:233-238.
- Olson CR, Freeman RD. 1980. Profile of sensitive period for monocular deprivation in kittens. *Exp. Brain Res*. 39:17-21.
- Olveczky BP, Andalman AS, Fee MS. 2005. Vocal experimentation in the juvenile songbird requires a basal ganglia circuit. *PLoS Biol*. 3:e153.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol*. 54:581-618.
- Paratcha GC, Ibarra GR, Cabrera R, Azcurra JM. 1998. Decreased phosphorylation of GAP-43/B-50 in striatal synaptic plasma membranes after circling motor activity. *Neurochem. Res*. 23:1241-1249.
- Paratcha GC, Ibarra GR, Wolansky MJ, Rodríguez JA, Azcurra JM. 1999. Decreased GAP-43/B-50 phosphorylation in striatal synaptic plasma membranes after circling motor behavior during development. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 65:34-43.
- Parent A. 1990. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci*. 13:254-258.
- Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev*. 20:91-127.
- Park MR, Lighthall JW, Kitai ST: 1980. Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res*. 194:359-369.
- Paulsen JS, Butters N, Salmon DP, Heindel WC, Swenson MR. 1993. Prism adaptation in Alzheimer's and Huntington's disease. *Neuropsychol*. 7:73-81.
- Penney JB, Young AB. 1983. Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Ann Rev Neurosci*. 6:73-94.
- Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE. 1985. 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.
- Phelps PE, Brady DR, Vaughn JE. 1989. The generation and differentiation of cholinergic neurons in rat caudate-putamen. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 46:47-60.
- Pin JP, Duvoisin R. 1995. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 34:1-26.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P. 2001 (a). Functional coexpression of excitatory mGluR1 and mGluR5 on striatal cholinergic interneurons. *Neuropharmacology.* 40:460-463.
- Pisani A, Gubellini P, Bonsi P, Conquet F, Picconi B, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P. 2001 (b). Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience.* 106:579-587.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298:1248-1251.
- Platz T, Denzler P, Kaden B, Mauritz KH. 1994. Motor learning after recovery from hemiparesis. *Neuropsychologia.* 32:1209-1223.
- Plotkin JL, Wu N, Chesselet MF, Levine MS. 2005. Functional and molecular development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons and their cortical inputs. *Eur. J. Neurosci.* 22:1097-1108.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. 1996. N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J. Neurochem.* 66:692-700.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. 1997. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comp. Neurol.* 378:70-87.
- Prange O, Murphy TH. 2001. Modular transport of postsynaptic density-95 clusters and association with stable spine precursors during early development of cortical neurons. *J. Neurosci.* 21:9325-9333.
- Purves D, Lichtman JW. 1980. Elimination of synapses in the developing nervous system. *Science.* 210:153-157.
- Pysh JJ, Weiss B. 1979. Exercise during development induces an increase in Purkinje cell dendritic tree size. *Science* 206:230-232.
- Qin ZH, Chen JF, Weiss B. 1994. Lesions of mouse striatum induced by 6-hydroxydopamine differentially alter the density, rate of synthesis and level of gene expression of D1 and D2 dopamine receptors. *J. Neurochem.* 62:411-420.
- Quinlan EM, Olstein DH, Bear MF. 1999. Bidirectional, experience-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition in the rat

- visual cortex during postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:12876-12880.
- Quinlan EM, Lebel D, Brosh I, Barkai E. 2004. A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications. *Neuron.* 41:185-192.
- Raghunathan A, Matthews GA, Lombroso PJ, Naegele JR. 1996. Transient compartmental expression of a family of protein tyrosine phosphatases in the developing striatum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 91:190-199.
- Rauschecker JP. 1995. Compensatory plasticity and sensory substitution in the cerebral cortex. *Trends Neurosci.* 18:36-43.
- Rauscher FJ 3rd, Cohen DR, Curran T, Bos TJ, Vogt PK, Bohmann D, Tjian R, Franza BR Jr. 1988. Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science.* 240:1010-1016.
- Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E. 1979. The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* 187:261-283.
- Richter CP, Wang GH. 1926. New apparatus for measuring the spontaneous motility of animals. *J. Lab. Clin. Med.* 12:289-292.
- Robbins TW, Cador M, Taylor JR, Everitt BJ. 1989. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13:155-162.
- Robbins TW, Everitt BJ. 1996. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr. Op. Neurobiol.* 6:228-236.
- Roberts EB, Meredith MA, Ramoa AS. 1998. Suppression of NMDA receptor function using antisense DNA blocks ocular dominance plasticity while preserving visual responses. *J. Neurophysiol.* 80:1021-1032.
- Roberts EB, Ramoa AS. 1999. Enhanced NR2A subunit expression and decreased NMDA receptor decay time at the onset of ocular dominance plasticity in the ferret. *J. Neurophysiol.* 81:2587-2591.
- Roberts PJ, Storm-Mathisen J, Johnston GAR. 1981. Glutamate: Transmitter in the central nervous system. Chichester, UK: Wiley.
- Robinson TE, Becker JB. 1983. The rotational behavior model: asymmetry in the effects of unilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra in rats. *Brain Res.* 264:127-131.
- Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune Ly C, Ehlers MD, Wenthold RJ. 2001. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* 4:794-802.
- Rodier PM, Reynolds SS, Roberts WN. 1979. Behavioral consequences of interference with CNS development in the early fetal period. *Teratology.* 19:327-336.
- Rodier PM. 1980. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev. Med. Child. Neurol.* 22:525-545.
- Rodier PM. 1988. Structural-functional relationship in experimentally induced brain damage. *Prog. Brain Res.* 73:335-348.

- Rogers RL, Meyer JS, Mortel KF. 1990. After reaching retirement age physical activity sustains cerebral perfusion and cognition. *J. Am. Geriatr. Soc.* 38:123-128.
- Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF. 2004. Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 469:325-339.
- Sadato N, Pascual-Leone A, Grafman J, Ibáñez V, Deiber MP, Dold G, Hallett M. 1996. Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects. *Nature.* 380:526-528.
- Sadikot AF, Burhan AM, Bélanger MC, Sasseville R. 1998. NMDA receptor antagonists influence early development of GABAergic interneurons in the mammalian striatum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 105:35-42.
- Sagar M, Sharp FR, Curran T. 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* 240:1328-1331.
- Saint-Cyr JA, Ungerleider LG, Desimone R. 1990. 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.
- Sakagami H, Kondo H. 1993. Differential expression of mRNAs encoding gamma and delta subunits of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II (CaM kinase II) in the mature and postnatally developing rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 20:51-63.
- Sakagami H, Ebina K, Kondo H. 1994. Localization of phosphatase inhibitor-1 mRNA in the developing and adult rat brain in comparison with that of protein phosphatase-1 mRNAs. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 25:7-18.
- Salmon DP, Butters N. 1995. Neurobiology of skill and habit learning. *Curr. Op. Neurobiol.* 5:184-190.
- Sanes DH, Takacs C. 1993. Activity-dependent refinement of inhibitory connections. *Eur. J. Neurosci.* 5: 570-574.
- Sanes JR, Lichtman JW. 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:389-442.
- Sauer H, Fischer W, Nikkhah G, Wiegand SJ, Brundin P, Lindsay RM, Bjorklund A. 1993. Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. *Brain Res.* 626:37-44.
- Scatchard G: 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660-672.
- Schlaggar BL, Fox K, O'Leary DDM. 1993. Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature.* 364:623-626.
- Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Brecht DS, Nicoll RA. 2002. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:13902-13907.
- Schofield PR, Schivers BD, Seeburg PH. 1990. The role of receptor subtype diversity in the CNS. *Trends Neurosci.* 13:8-11.

- Schultz W, Apicella P, Ljungberg T. 1993. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J. Neurosci.* 13:900-913.
- Swartz WJ, Gunn RH, Sharp FR, Evarts EV. 1976. Unilateral electrolytic lesions of the substantia nigra cause contralateral circling in rats. *Brain Res.* 105:358-361.
- Seeburg PH. 1993. The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16:359-365.
- Sharpe NA, Tepper JM. 1998. Postnatal development of excitatory synaptic input to the rat neostriatum: an electron microscopic study. *Neuroscience.* 84:1163-1175.
- Shatz CJ, Kirkwood PA. 1984. Prenatal development of functional connections in the cat's retinogeniculate pathway. *J. Neurosci.* 4:1378-1397.
- Sheng M, Cummings J, Roldán LA, Jan YN, Jan LY. 1994. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature.* 368:144-147.
- Sherman SM, Spear PD. 1982. Organization of visual pathways in normal and visually deprived cats. *Physiol. Rev.* 62:738-855.
- Sheth AN, McKee ML, Bhide PG. 1998. The sequence of formation and development of corticostriate connections in mice. *Dev. Neurosci.* 20:98-112.
- Silver J, Miller JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:146-156.
- Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM. 2004. Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J. Child Neurol.* 19:343-360.
- Simon DK, Prusky GT, O'Leary DD, Constantine-Paton M. 1992. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89:10593-10597.
- Singer W. 1995. Development and plasticity of cortical processing architectures. *Science.* 270:758-764.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* 86:353-387.
- Soghomonian JJ, Martin DL. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol. Sci.* 19:500-505.
- Soiza-Reilly M, Fossati M, Ibarra GR, Azcurra JM. 2004. Different dopamine D1 and D2 receptors expression after motor activity in the striatal critical period. *Brain Res.* 1004:217-221.
- Standaert DG, Testa CM, Young AB, Penney JB Jr. 1994. Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.* 343:1-16.
- Standaert DG, Testa CM, Rudolf GD, Hollingsworth ZR. 1996. Inhibition of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunit expression by antisense

- oligonucleotides reveals their role in striatal motor regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276:342-352.
- Standaert DG, Friberg IK, Landwehrmeyer GB, Young AB, Penney JB Jr. 1999. Expression of NMDA glutamate receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the striatum of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64:11-23.
- Stecher J, Müller WE, Hoyer S. 1997. Learning abilities depend on NMDA-receptor density in hippocampus in adult rats. *J. Neural Transm.* 104:281-289.
- Stefani A, Pisani A, Mercuri NB, Calabresi P. 1996. The modulation of calcium currents by the activation of mGluRs. Functional implications. *Mol. Neurobiol.* 13:81-95.
- Stein V, House DR, Bredt DS, Nicoll RA. 2003. Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J. Neurosci.* 23:5503-5506.
- Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore AT, Vaaland JL, Edminson P, Haug FM, Ottersen OP. 1983. First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature.* 301:517-520.
- Subramaniam S, McGonigle P. 1994. Regional profile of developmental changes in the sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines. *J. Neurochem.* 62:1408-1415.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA. 1995. Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J. Neurosci.* 15:6509-6520.
- Sun L, Margolis FL, Shipley MT, Lidow MS. 1998. Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Lett.* 441:392-396.
- Sun L, Shipley MT, Lidow MS. 2000. Expression of NR1, NR2A-D, and NR3 subunits of the NMDA receptor in the cerebral cortex and olfactory bulb of adult rat. *Synapse.* 35:212-221.
- Surmeier DJ, Kitai ST. 1994. Dopaminergic regulation of striatal efferent pathways. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4:915-919.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z. 1996. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 16:6579-6591.
- Suzuki T, Miura M, Nishimura K, Aosaki T. 2001. Dopamine-dependent synaptic plasticity in the striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 21:6492-6501.
- Swaab DP, Boer GJ, Feenstra MGP. 1988. Concept of functional neuroanatomy and the importance of neurochemistry. *Prog. Brain Res.* 73:3-13.

- Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ. 1998. Postnatal development of dopamine D4-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D2-like receptors. *Dev. Brain Res* 110:227-233.
- Tepper JM, Trent F. 1993. In vivo studies of the postnatal development of rat neostriatal neurons. *Prog. Brain Res.* 99:35-50.
- Tepper JM, Sharpe NA, Koós TZ, Trent F. 1998. Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev. Neurosci.* 20:125-145.
- Tepper JM, Koós T, Wilson CJ. 2004. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* 27:662-669.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 274:1123-1133.
- Thanos PK, Jhamandas K, Beninger RJ. 1992. N-methyl-D-aspartate unilaterally injected into the dorsal striatum of rats produces contralateral circling: antagonism by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid and cis-flupenthixol. *Brain Res.* 589:55-61.
- Thompson WK. 1985. Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5:167-182.
- Tian N, Petersen C, Kash S, Baekkeskov S, Copenhagen D, Nicoll R. 1999. The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma-aminobutyric acid release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:12911-12916.
- Toth E, Lajtha A. 1989. Motor effects of intracaudate injection of excitatory amino acids. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33:175-179.
- Tsukahara N. 1981. Synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 4:351-379.
- Ułtas J, Brunner LC, Geddes JW, Choe W, Cotman CW. 1992. N-methyl-D-aspartate receptor complex in the hippocampus of elderly, normal individuals and those with Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 49:45-61.
- Ungerstedt U, Arbunthnott GW. 1970. Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24:485-493.
- Uylings HBM, Kuypers K, Diamond MC, Veltman WAM. 1978. Effects of differential environments on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats. *Exp. Neurol.* 62:658-677.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2:266-270.
- Vaynman SS, Ying Z, Yin D, Gomez-Pinilla F. 2006. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res.* 1070:124-130.
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. 2000. Role of hippocampal signaling pathways in

- long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn. Mem.* 7:333-340.
- Vickers CA, Stephens B, Bowen J, Arbuthnott GW, Grant SG, Ingham CA. 2006. Neurone specific regulation of dendritic spines in vivo by post synaptic density 95 protein (PSD-95). *Brain Res.* 1090:89-98.
- Vincent SR, Kimura H. 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 46:755-784.
- Von Voigtlander PF, Moore KE. 1973. Turning behaviour of mice with unilateral 6-hydroxydopamine lesions in the striatum: effect of apomorphine, L-Dopa, amantadine, amphetamine and other psychomotor stimulants. *Neuropharmacology.* 12:451-462.
- Vorhees CV. 1987. Reliability, sensitivity and validity of behavioral indices of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 9:445-464.
- Vorobjev VS, Sharonova IN, Walsh IB, Haas HL. 1993. Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron.* 11:837-844.
- Walsh MK, Lichtman JW. 2003. In vivo time-lapse imaging of synaptic takeover associated with naturally occurring synapse elimination. *Neuron.* 37:67-73.
- Wang C, Anastasio N, Popov V, Leday A, Johnson KM. 2004. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors by phencyclidine causes the loss of corticostriatal neurons. *Neuroscience.* 125:473-483.
- Weir MD, Patel AJ, Hunt A, Thomas DG. 1984. Developmental changes in the amount of glial fibrillary acidic protein in three regions of the rat brain. *Brain Res.* 317:147-154.
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. 1997. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J. Neurochem.* 68:469-478.
- Wichmann T, DeLong MR. 1993. Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv. Neurol.* 60:53-61.
- Wiesel TN. 1982. Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature.* 299:583-591.
- Williams RW, Herrup K. 1988. The control of neuron number. *Ann. Rev. Neurosci.* 11:423-453.
- Wilson Cj, Groves PM. 1980. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 194:599-615.
- Wilson CJ. 2007. GABAergic inhibition in the neostriatum. *Prog. Brain Res.* 160:91-110.
- Wise RA. 1981. Intracranial self-stimulation: mapping against the lateral boundaries of the dopaminergic cells of the substantia nigra. *Brain Res.* 213:190-194.

- Wolansky MJ, Cabrera RJ, Ibarra GR, Mongiat LA, Azcurra JM (a). 1999. Exogenous NGF alters a critical motor period in rat striatum. *Neuroreport*. 10:1-5.
- Wolansky JM, Paratcha GC, Ibarra GR, Azcurra JM (b). 1999. Nerve growth factor preserves a critical motor period in rat striatum. *J. Neurobiol.* 38:129-136.
- Wolansky JM, Soiza-Reilly M, Fossati M, Azcurra JM. 2004. Postnatal haloperidol eliminates the deficit in circling behavior produced by prenatal exposure to the same drug. *Neurotoxicol. Teratol.* 26:561-569.
- Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. 1986. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 83:7104-7108.
- Wong EH, Knight AR, Woodruff GN. 1988. [3H]MK-801 labels a site on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex in rat brain membranes. *J. Neurochem.* 50:274-281.
- Woolsey TA, Van der Loos H. 1970. The 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.
- Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S. 1994. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell.* 79:729-742.
- Yamamoto BK, Freed CR. 1982. The trained circling rat: a model for inducing unilateral caudate dopamine metabolism. *Nature.* 298:467-468.
- Yao WD, Gainetdinov RR, Arbuckle MI, Tatyana D, Sotnikova MC, Beaulieu JP, Torres GE, Grant SG, Caron MG. 2004. Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron.* 41:625-638.
- Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ. 1991. Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:1291-1295.
- Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D. 1991. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10037-10041.