

1990-B

REG. No. 081298661

# Universidad de Guadalajara

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINA  
ACETILTRANSFERASA (E.C. 2.3.1.6.) EN EL CEREBRO DE  
RATAS TRATADAS NEONATALMENTE CON  
L-GLUTAMATO MONOSODICO.

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A  
FRANCISCO GARZA BRISEÑO

---

Guadalajara, Jalisco, Septiembre de 1992

---

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

EVA Y NICOLAS

A MI HERMANA:

MARCELA

## AGRADECIMIENTOS

Al Biol. Daniel Ortuño Sahagún, por la dirección, apoyo y valiosos consejos para la realización del presente trabajo.

Al M. en C. Carlos Beas Zárate, por sus sugerencias y por la revisión ala presente tesis.

A las Biólogas Georgina Guzmán y Martha Rivera, por su valiosa ayuda durante la etapa experimental.

A mis maestros, por sus enseñanzas.

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Neuroquímica del Área de investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección del Biol. Daniel Ortuño Sahagún y la asesoría del M.en C. Carlos Beas Zárate.

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
HIPOTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL Y METODOS.....	30
DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	34
RESULTADOS.....	36
DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	47
RELACION DE FIGURAS Y TABLAS.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Acetilcolina
ACE	Acetilcolinesterasa
[ <sup>14</sup> C] Acetil CoA	Acetil coenzima A marcada con Carbono 14
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca <sup>++</sup>	Ion Calcio
CAT	Colina acetiltransferasa
Cl <sup>-</sup>	Ion Cloro
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
Glu	Glutamato
GMS	Glutamato monosódico
i.p.	Intraperitoneal
K <sup>+</sup>	Ion Potasio
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
mg	Miligramo
μg	Microgramo
ml	Mililitro
μl	Microlitro
mCi	MiliCurie
Na <sup>+</sup>	Ion Sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
pH	Potencial de hidrógeno
[ <sup>3</sup> H] QNB	Quinuclidinil benzilato tritiado
SENaCl	Solución de NaCl equimolar a la de GMS
SNC	Sistema nervioso central

## INTRODUCCION

## EPILEPSIA

La epilepsia ha sido uno de los grandes problemas de la humanidad, tanto por su alta prevalencia e incidencia, como por sus consecuencias médicas y sociales. Desde los tiempos hipocráticos se ha insistido en borrar la creencia del carácter sobrenatural de la epilepsia; sin embargo, por temor e ignorancia, hasta la fecha, el enfermo epiléptico sigue siendo objeto de discriminación en nuestra sociedad. En su tiempo, Hipócrates señaló: "En cuanto a la enfermedad que llamamos sagrada, he aquí lo que es: ella no me parece más sagrada ni más divina que las otras, ella tiene la misma naturaleza que el resto de las otras enfermedades; y por origen, las mismas causas que cada una de ellas. Los hombres le han atribuido una causa divina por ignorancia y por el asombro que les inspira, pues no se parece a las enfermedades ordinarias".

Etimológicamente, la palabra epilepsia deriva de una preposición y de un verbo irregular griego, que significa: "ser sobrecogido bruscamente". La definición de epilepsia ha provocado polémica entre las diferentes escuelas neurológicas, lo que creó confusión en la literatura así como comunicaciones epidemiológicas conflictivas, ya que se utilizaban definiciones distintas. Por esta razón, en 1973, la Liga Internacional contra la Epilepsia y la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicaron un diccionario de epilepsia en el que la definen como: una afección crónica de etiología diversa, caracterizada por crisis recurrentes, debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epilépticas), asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas.

La característica clínica más importante de la epilepsia es la variabilidad de las manifestaciones según el sitio de descarga y, por otro lado, lo impredecible de su presentación y reaparición, con periodos asintomáticos que pueden durar minutos, días, meses o años (Rubio-Donnadieu, 1986)..

## MODELOS EXPERIMENTALES DE EPILEPSIA

La limitación natural que existe al intentar estudiar la epilepsia en humanos, mediante técnicas invasivas o ensayos farmacológicos, ha creado la necesidad de buscar modelos experimentales de epilepsia que semejen a la epilepsia humana. Para desarrollar un modelo experimental de epilepsia, generalmente se eligen mamíferos que presenten manifestaciones eléctricas y conductuales similares a las de la epilepsia humana.

Un modelo experimental de epilepsia se considera como tal cuando las alteraciones paroxísticas son "espontáneamente" recurrentes. En la actualidad, los modelos de epilepsia más estudiados son: el provocado por la estimulación eléctrica repetitiva y subumbral (Kindling) y los inducidos por la aplicación tópica de crema de alúmina o polvo de cobalto en la corteza cerebral. Sin embargo, existe una gran variedad de modelos experimentales en los cuales es posible inducir, en forma aguda, un número variable de crisis convulsivas apreciables conductual y electrofisiológicamente. Dado que estos modelos no son espontáneamente recurrentes y, por tanto, no son crónicos, sería más apropiado denominarlos modelos experimentales de crisis epileptiformes (Solís-Ortiz y Arauz-Contreras, 1986).

Para el estudio de crisis epileptiformes mediante modelos experimentales tenemos ciertas drogas que producen crisis si se administran tópicamente en el cerebro. Por ejemplo: la estriquina (antagonista a glicina), bicuculina (antagonista a GABA), picrotoxina (antagonista a GABA), el pentilentetrazol (probable antagonista a GABA) y la hidrazida (que reduce la concentración del GABA por inhibición de la GAD). Si bien estos agentes producen crisis éstas no son intermitentes, son más bien continuas y pueden conducir tanto a la muerte como a la recuperación completa al terminar el efecto de la droga por ser metabolizada o excretada (Craig y Colasanti, 1987).

La cuestión técnica acerca de como la droga llega a la neurona es muy importante. Así, la administración sistémica, la aplicación iontoforética, o la administración del agente en el medio que rodea a una neurona *in vitro*, puede resultar en una exposición diferencial del cuerpo celular o procesos celulares de una neurona a la droga convulsionante. Estas diferencias pueden afectar la magnitud y aún la naturaleza del efecto observado. Cada vía de administración proporciona información útil, pero la administración al animal íntegro *in vivo* produce datos más relevantes sobre los mecanismos involucrados en la producción de las crisis (Faingold, 1987).

Un factor importante a considerar en el establecimiento de los mecanismos de inducción de crisis es que las neuronas de diferentes regiones del SNC de mamíferos no son afectadas en la misma forma por dichas drogas. Así, la neuroanatomía del SNC deberá ser considerada al tratar de entender los mecanismos mediante los cuales las drogas convulsionantes producen las crisis. (Faingold, 1987).

En la actualidad, el estudio controlado y sistemático de los modelos experimentales de epilepsia (modelos experimentales de epilepsia verdadera y modelos experimentales de crisis epileptiformes) han tenido tres aplicaciones fundamentales:

a) En el estudio de los mecanismos neuronales que, en condiciones normales, se relacionan con la regulación de la excitabilidad del SNC y con la regulación de la actividad motora.

b) En el estudio de los mecanismos neuronales básicos implicados en la generación y autosupresión de las crisis epilépticas, sean o no convulsivas.

c) En el ensayo de drogas anticonvulsionantes que pudieran tener una aplicación efectiva en la terapéutica de la epilepsia en humanos (Solís-Ortiz y Araus-Contreras, 1986).

## INDUCCION DEL PROCESO EPILEPTICO POR ADMINISTRACION SISTEMICA DE SUSTANCIAS CONVULSIONANTES

La administración de sustancias convulsionantes por vía sistémica es un procedimiento frecuentemente empleado en los estudios de epilepsia. Entre las drogas que se utilizan están el pentilentetrazol, el L-glutamato monosódico, la bicuculina, la estriknina, el rojo de rutenio y la 4-aminopiridina.

En estos modelos las alteraciones paroxísticas no son espontáneamente recurrentes, por lo que entran dentro de la categoría de los modelos experimentales de crisis epileptiformes. El procedimiento que se sigue para producir las crisis convulsivas en estos modelos consiste en administrar el agente convulsionante por vía intraperitoneal (i.p.), intravenosa o subcutánea. La administración de la sustancia convulsionante por vía sistémica permite su distribución homogénea en la red de capilares sanguíneos cerebrales, por lo que su acceso al parénquima cerebral queda condicionado por las características regionales de la permeabilidad capilar al agente químico en estudio, lo cual se conoce como fenómeno de barrera hematoencefálica (BHE). Esta disponibilidad, casi homogénea, del convulsionante en el sistema nervioso parece ser de gran utilidad para los estudios de carácter neuroquímico (Solís-Ortiz y Arauz-Contreras, 1986).

## ANTECEDENTES

## DISTRIBUCION DEL SISTEMA COLINERGICO EN EL CEREBRO DE LA RATA

Por muchos años se utilizaron técnicas histoquímicas para visualizar la actividad de la enzima que degrada a la acetilcolina (AC), la acetilcolinesterasa (ACE) (Koelle y Friedenwald, 1949; Karnovsky y Roots, 1964). En una serie de estudios, estas técnicas fueron empleadas por Shute y Lewis para identificar estructuras colinérgicas y sus proyecciones (Lewis y Shute, 1967; Shute y Lewis, 1967). De cualquier manera, posteriormente se descubrió que la localización de la ACE no está solo limitada a neuronas colinérgicas (Koelle, 1963; Silver, 1974; Jacobowitz, 1977), por lo que los investigadores cambiaron a un marcador colinérgico más específico, la colina acetiltransferasa (CAT) (Storm-Mathisen, 1977).

Hay un consenso general de que la enzima que sintetiza a la AC, la CAT (E.C. 2.3.1.6) (Nachmansohn y Machado, 1943), es el marcador más específico de estructuras colinérgicas, particularmente en el cerebro (Kuhar, 1976; Levey y col., 1983a; Wainer y col., 1984). Sin embargo, existía una dificultad extrema para purificar la enzima con las técnicas bioquímicas convencionales, por lo que la especificidad de varios antisueros producidos contra la CAT purificada fué puesta en duda (Rossier, 1975; Rossier, 1981; Wainer y col., 1984). A principios de los años 80, la nueva tecnología de producción de anticuerpos monoclonales fué aplicada a este problema y varios laboratorios desarrollaron anticuerpos contra la CAT, los cuales demostraron ser específicos por una gran variedad de criterios inmunoquímicos (Levey y col., 1981; Crawford y col., 1982; Eckenstein y Thoenen, 1982; Levey y col., 1983b). Desde entonces, una gran variedad de anticuerpos

específicos se han desarrollado, y se ha obtenido bastante información sobre la distribución de estructuras colinérgicas en el cerebro de varias especies, por ejemplo: en el reptil *Caiman crocodilus* (Brauth y col., 1985), en la tortuga de agua dulce *Pseudemys scripta elegans* (Mufson y col., 1984), en el pollo (Johnson y Epstein, 1986), en la rata (Armstrong y col., 1983; Ichikawa e Hirata, 1986), en el cobayo (Maley y col., 1988), en el hurón (Henderson, 1987), en el gato (Vincent y Reiner, 1987), en bovinos (Ishida y col., 1987), en monos (Hedreen y col., 1983), y en el humano (Nagai y col., 1983) entre otros.

Con la implementación de la inmunohistoquímica, es posible ahora, definir claramente la distribución anatómica de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal, así como sus conexiones con la corteza cerebral (Wainer y Mesulam, 1990).

Así, la corteza cerebral es rica en AC y sus enzimas (CAT, ACE) (Kuhar, 1976). Se ha demostrado que la mayoría de las estructuras colinérgicas corticales derivan de proyecciones de neuronas multipolares largas del cerebro anterior basal (Eckenstein y col., 1988), estas neuronas no forman distintos núcleos, sino que más bien, se extienden a lo largo del cerebro anterior basal y están contenidas en varios núcleos (Wainer y Mesulam, 1990). De esta forma y para dar a conocer la heterogenicidad neuronal de esta región y de la organización de las proyecciones colinérgicas, se introdujo una clasificación que designa "Ch" (Ch1-Ch8) a subgrupos de neuronas colinérgicas contenidas dentro de varios núcleos y que proyectan fibras a objetivos corticales y subcorticales (Mesulam y col., 1983a; Mesulam y col., 1983b).

Las neuronas contenidas dentro del cerebro anterior basal (Ch1-Ch4) proporcionan la mayor fuente de inervación colinérgica a la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala y el bulbo olfatorio. Mientras que, las neuronas colinérgicas en el tronco cerebral (Ch5-Ch6) proporcionan la mayor fuente de inervación colinérgica al tálamo, hipotálamo y cerebro anterior basal (Fig. 1). Es interesante notar que las vías colinérgicas tienen influencia sobre la actividad cortical en forma directa por proyecciones corticopetales (Ch1-Ch4) y en forma indirecta por proyecciones talamopetales (Ch5-Ch6). Un punto potencialmente importante de interacción directa ocurre al nivel del núcleo reticular talámico, el cual recibe entradas colinérgicas tanto del tronco cerebral como del cerebro anterior basal (Fig. 1) (Mesulam y col., 1983b; Rye y col., 1984; Saper, 1984).

## ACETILCOLINA

Existe una evidencia considerable de que la AC aparece dentro del esquema evolutivo mucho antes de la formación de un sistema nervioso. Bacterias, hongos, protozoarios y plantas poseen capacidad de biosintetizar y degradar AC. Aún en sistemas superiores, la distribución de la AC no está solo limitada al sistema nervioso. Por ejemplo, la AC se localiza también en la córnea, en algunos epitelios ciliados, en el bazo de los ungulados y en la placenta humana (Rama-Sastry, 1979). Si bien aún no existe evidencia definitiva, se ha propuesto que la AC tiene una participación importante en el desarrollo y la diferenciación tisular.

La AC fué identificada por Hunt en 1907 como un posible mediador de funciones celulares, posteriormente Dale (1914) señaló que su acción mimetiza la estimulación nerviosa parasimpática. Loewi, en 1921, proporcionó evidencia clara sobre la liberación de AC por estimulación nerviosa. La existencia de cierta variedad de receptores que explicaría las diferentes actividades de la AC llegó a ser aparente en los experimentos realizados por Dale (1914). El receptor de tipo nicotínico para la AC fué el primero en ser purificado y determinada su estructura primaria (Numa y col., 1983; Changeux y col., 1984). En la década pasada se determinaron las estructuras primarias de varios subtipos de receptores (nicotínicos y muscarínicos), así como de varias colinesterasas y de la CAT (Taylor y Heller, 1989).

La clasificación de los subtipos de receptores colinérgicos en el sistema nervioso se basa en la actividad farmacológica de dos alcaloides: nicotina y muscarina, de ahí su denominación. Los receptores nicotínicos se subdividen en N1 localizados a nivel de la unión neuromuscular y los N2 ubicados en ganglios periféricos, y difieren entre sí por sus características farmacológicas. Por otra parte, los receptores muscarínicos se subdividen según su afinidad por la pirenzepina: se denominan M1 a los que presentan alta afinidad, estos predominan en ganglios y neuronas, y M2 a aquellos con baja afinidad, que se localizan en músculo liso, glándulas secretorias y miocardio. Estos últimos se clasifican a su vez por su afinidad al AF-DX 116 (Hammer y col., 1980; Hirschowitz y col., 1984). A nivel de SNC predominan los receptores muscarínicos, en particular los del tipo M1, en cuerpo estriado, hipocampo y corteza cerebral (Taylor y Heller, 1989).

En cuanto a su localización subcelular, la AC se encuentra distribuida tanto en las terminales nerviosas como en el cuerpo neuronal y los axones pero, a diferencia de la que se localiza en estas estructuras, la AC de las terminales nerviosas se concentra en vesículas sinápticas (AC unida establemente) y no solo en la fracción celular soluble (AC libre) (Sandoval y Torner-Aguilar, 1986).

## SINTESIS Y DEGRADACION DE LA ACETILCOLINA

La AC se sintetiza a partir de sus dos precursores inmediatos, la colina y la acetil coenzima A (Fig. 2). Esta reacción se lleva a cabo en un solo paso catalizado por la enzima colina acetiltransferasa (CAT) (EC 2.3.1.6):



La CAT se localiza en el SNC, específicamente en los sitios donde tiene lugar la síntesis de AC. Por ejemplo, la enzima se encuentra en concentraciones relativamente altas, en el núcleo caudado, hipocampo y corteza cerebral. Dentro de las neuronas colinérgicas, la CAT se concentra en las terminales nerviosas, aunque también está presente en los axones, por donde se transporta desde su sitio de síntesis en el soma. Cuando se realizan estudios de fraccionamiento celular, la CAT se recupera en la fracción sinaptosomal (localizada en el citoplasma principalmente). Se ha sugerido que bajo condiciones fisiológicas la CAT también se localiza en el exterior de la vesícula de almacenamiento y por lo tanto la AC sintetizada tiene una ubicación favorable para entrar en la vesícula sináptica (Taylor y Heller, 1989).

La acetil CoA utilizada para la síntesis de AC en cerebro de mamíferos proviene del piruvato formado por la glucosa. Aún no se conoce el mecanismo por el cual la acetil CoA formada en la membrana interior de la mitocondria se transporta para la síntesis de AC. Ya que como se mencionó anteriormente la CAT se localiza principalmente en el citoplasma sinaptosomal (Cooper y col., 1982).

Por otra parte, las neuronas no pueden sintetizar colina *de novo*, por lo que deben obtenerla del plasma o de compuestos que la contengan (Taylor y Heller, 1989). La colina está presente en el plasma en una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Existen dos sistemas de captación de colina: uno de "baja afinidad" con una Km de 10 a 100  $\mu\text{M}$  presente en todos los tejidos, y otro de "alta afinidad" dependiente de sodio con una Km de 1 a 5  $\mu\text{M}$  que se presenta en las neuronas colinérgicas. La captación de alta afinidad se satura a 10  $\mu\text{M}$ , por lo que la concentración plasmática de colina es adecuada para sostener la síntesis de AC aún en condiciones demandantes, como se observa en ganglios (Jope, 1979).

Aproximadamente la mitad de la colina que se emplea en la síntesis de AC proviene directamente de la AC liberada y que se hidroliza por la acción de la ACE. Otra fuente de colina es la fosfatidilcolina. En el SNC estas fuentes son particularmente importantes, ya que la colina no atraviesa la BHE. Así, en el SNC la captación de alta afinidad de colina podría no saturarse y, la síntesis de AC podría estar limitada por la disposición de colina durante periodos de actividad sostenida. Lo anterior coincide con el hecho de que los niveles de AC en cerebro varían, mientras que en ganglios y músculo permanecen constantes (Taylor y Heller., 1989).

Existen tres mecanismos para regular el nivel de AC en las células: inhibición por retroalimentación de la AC sobre la CAT, acción en masa, y la disponibilidad de acetil CoA y colina. De estas tres posibilidades el principal factor regulador parece ser la captación de colina de alta afinidad (Cooper y col., 1982). Experimentos realizados con 3-hemicolinio, que bloquea el sistema de captación de alta afinidad, demuestran una importante reducción en la síntesis de AC (Jope, 1979).

La actividad enzimática de la CAT se determinó por primera vez en una preparación libre de células por Nachmansohn y Machado en 1943. La enzima se ha purificado de diversas fuentes y se ha clonado de *Drosophila melanogaster* (Itoh y col., 1986). La purificación de la CAT ha permitido la producción de anticuerpos específicos para fin de la localización inmunohistoquímica de estructuras colinérgicas utilizando esta enzima como marcador específico.

La enzima purificada a partir de cerebro de mamíferos, es una proteína con un peso molecular de 66 a 70 KD. Hay varias isoenzimas con diferentes puntos isoeléctricos (Dietz y Salvaterra, 1980), posiblemente, éstas difieran en su asociación con las vesículas. La enzima tiene una Km para la colina de 1 mM y para la acetil CoA de 10  $\mu$ M.

Por otra parte, la degradación de la AC se lleva a cabo por medio de un mecanismo de modificación enzimática en el espacio sináptico. La enzima responsable es la ACE, ésta se encuentra en las membranas neuronales, aunque puede tener origen postsináptico como en el caso de



En general podemos distinguir dos clases de acetilcolinesterasas: la primera de ellas (clase homóloga), consiste en la asociación de subunidades catalíticas idénticas. Las formas individuales difieren en su grado de asociación (monómeros, dímeros y tetrameros) y en su hidrofobicidad. Esto último parece ser una consecuencia de la adición de un glucosfolípido en el carboxilo terminal lo cual se aprovecha para localizar la enzima en la superficie extracelular de la membrana. La segunda clase es una asociación heteróloga de subunidades estructurales y catalíticas unidas mediante enlaces disulfuro. Una forma existe como una asociación de hasta 12 subunidades catalíticas con un filamento único de colágeno. Estas formas son frecuentemente denominadas asimétricas, ya que el filamento único proporciona una asimetría dimensional sustancial a la molécula. Una segunda forma parece ser un tetramero de subunidades catalíticas unidas covalentemente a un lípido mediante una cola única (Taylor y Heller, 1989).

## LA TRANSMISION COLINERGICA

La liberación de AC requiere  $Ca^{++}$  extracelular, el cual entra a la neurona cuando es despolarizada (Fig. 3). El mecanismo por el cual este incremento en la concentración intraterminal de  $Ca^{++}$  provoca la liberación de AC se desconoce, sin embargo; la fosforilación o activación de proteínas que induzcan la fusión de la vesícula con la membrana neuronal es una posibilidad. La dependencia de  $Ca^{++}$  es una característica común de todos los mecanismos de liberación por exocitosis, y es probable que la exocitosis sea un mecanismo conservado para la liberación del neurotransmisor.

Una vez en el espacio sináptico la AC se combina con el receptor postsináptico que puede ser de dos tipos: nicotínico o muscarínico (Fig. 3). Las respuestas mediadas por el receptor nicotínico son rápidas, con una duración de milisegundos, generalmente excitadoras y pueden ser inducidas tanto por AC como por nicotina. Las respuestas mediadas por el receptor muscarínico son más lentas, tienen una duración de segundos, pueden ser excitadoras e inhibitorias y son inducidas por AC y muscarina. Aparentemente, los receptores nicotínicos están asociados a canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , ya que incrementan la conductancia de estos iones, pero no afectan la conductancia de aniones.

Las consecuencias de la activación de los receptores muscarínicos varían de uno a otro tejido. En muchos casos, la apertura de ionóforos es un evento primario que puede aumentar la conductancia de  $\text{Na}^+$  y disminuir la de  $\text{K}^+$ , lo cual origina una respuesta excitadora, o puede reducir la conductancia de  $\text{Na}^+$  y aumentar la de  $\text{K}^+$ , lo cual determina una respuesta inhibitoria. Recientemente se ha descrito la presencia de receptores presinápticos de tipo muscarínico en neuronas centrales y se ha sugerido que actúan como un sistema de control por retroalimentación negativa (Sandoval y Turner-Aguilar, 1986).

Como ya se indicó, el mecanismo de eliminación de la AC del espacio intersináptico está relacionado con la actividad hidrolítica de la ACE. Una vez hidrolizada la AC alrededor de un 35 a 50 % de la colina libre es transportada de regreso a la terminal presináptica por un sistema de transporte activo de alta afinidad dependiente de  $\text{Na}^+$  para ser reutilizada en la síntesis de nueva AC. Se presume que la captación de esta colina derivada metabólicamente ocurre de manera

rápida, antes de que la colina difunda lejos del espacio inter-sináptico. La colina restante puede ser catabolizada o alternativamente llegar a ser incorporada en fosfolípidos, los que pueden servir nuevamente como fuente de colina (Cooper y col., 1982).

## GLUTAMATO

El glutamato (Glu) es el aminoácido neurotransmisor excitatorio más abundante en el cerebro, aunque está distribuido de manera ubicua en el SNC, se localiza principalmente en la corteza cerebral. Produce un incremento en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  provocando así la despolarización (Maynert y col., 1975).

El Glu ocupa una posición central en el metabolismo del cerebro y ha sido objeto de numerosos estudios durante las últimas décadas. Su papel en el metabolismo fué propuesto por Krebs (1935) y su potencia excitadora fué demostrada en músculo de crustáceos por Kravitz y col., (1970), y posteriormente, por administración tópica, en el cerebro de mamíferos por Cooper y col., (1982).

El Glu es un aminoácido no esencial que no cruza la BHE por lo que, en cerebro, se sintetiza a partir de glucosa y otros precursores, por diversas rutas (McGeer y McGeer, 1989). La vía más frecuente es a partir de glutamina, que se regula por la concentración de glutamina, Glu (producto) y por la actividad de la glutaminasa (Kvamme y Olsen, 1980).

El desarrollo de nuevos agonistas y antagonistas ha evidenciado la existencia de al menos tres distintas clases de receptores para los aminoácidos dicarboxílicos Glu y aspartato. Los tres receptores son activados preferentemente por N-metil-D-aspartato (NMDA), quisqualato, y Kainato (Watkins, 1981; McLennan, 1981).

### CONVULSIONES INDUCIDAS CON L-GLUTAMATO MONOSODICO

Desde hace tiempo han sido descritas diferentes actividades motoras manifestadas como crisis epileptiformes como consecuencia de la administración parenteral de GMS en ratas (Bhagaban y col., 1971; Johnston, 1973; Nemeroff y Crisley, 1975).

El L-GMS puede producir convulsiones en animales de laboratorio (Faingold, 1987; Craig y Colasanti, 1987). El efecto del GMS puede dividirse en dos periodos: preconvulsivo y convulsivo. El periodo convulsivo se inicia de 30 a 60 minutos después de la inyección de GMS. Las ratas de 3 y 10 días de edad inyectadas vía i.p. con 4 mg/g de GMS presentan un patrón convulsivo de tipo clónico-tónico, con un marcado predominio de la fase tónica.

En contraste, dosis similares de GMS inducen violentas crisis tónico-clónicas en ratas de 60 días de edad, mientras que en ratas de 180 días o más predominan las crisis clónicas y eventualmente pueden observarse crisis clónico-tónicas, sobre todo al final del efecto (Arauz-Contreras y Feria-Velasco, 1984; Solís-Ortiz y Arauz-Contreras, 1986).

Respecto a los mecanismos de producción de las crisis en este modelo, no hay información que los defina con precisión, sin embargo, las evidencias parecen indicar un probable desequilibrio entre los sistemas excitatorios e inhibitorios en el encéfalo, ya que el L-Glu es un neurotransmisor excitatorio central y el sustrato para la síntesis del ácido gamma-aminobutírico (GABA), conocido neurotransmisor inhibitorio (Solis-Ortiz y Arauz-Contreras, 1986).

### EFFECTO NEUROTOXICO DEL L-GLUTAMATO MONOSODICO

La neurotoxicidad de los aminoácidos excitadores se conoce desde hace casi 40 años (Hayashi, 1954). Sin embargo, los mecanismos de ésta aún no se han clarificado por completo. El Glu se considera un neurotóxico, en altas concentraciones produce destrucción excitotóxica de cuerpos neuronales en ratón, rata y otras especies (Olney, 1978), efecto que puede estar mediado por la activación de diversos receptores (Olney y col., 1981).

Aunque, en el adulto, es necesaria la administración intracerebral de grandes dosis para alcanzar niveles tóxicos debido a que existe una gran cantidad de sistemas de captación y presentan una distribución ubicua (Olney, 1978; Schwarcz y col., 1981). Lucas y Newhouse demostraron (1957) que el GMS administrado a ratones neonatos provoca una rápida degeneración de células ganglionares de la retina. Y también afecta al hipotálamo (principalmente núcleo arcuato) en primates (Olney, 1974).

En general se observa que los animales neonatos son más sensibles al efecto citotóxico del L-GMS que los adultos, esto debido a que no existe BHE y posiblemente también a que los sistemas de recaptura de este aminoácido aún no están completamente desarrollados (Olney, 1971), sin embargo existen evidencias de que bajo ciertas condiciones experimentales es posible incrementar significativamente, en el cerebro maduro de la rata, la vulnerabilidad al GMS (Köhler y Schwarcz, 1981; Olney, 1980). Así pues el efecto neurotóxico se presenta en ciertas áreas del SNC, en edades definidas y bajo condiciones específicas mediante un mecanismo aún poco conocido.

En su mecanismo de acción se propone la participación de receptores que provoquen una despolarización sostenida de la membrana e incrementen su permeabilidad afectando la homeostasis iónica (Olney, 1971; Olney, 1978). Se han propuesto dos mecanismos a través de los cuales las excitotoxinas pueden inducir muerte neuronal, Olney y col., (1986), propusieron que inicialmente el daño es provocado por una entrada masiva de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y agua, por otro lado, Jancsó y col., (1984), y Choi (1985) propusieron un segundo mecanismo de evolución neurotóxica más lenta y dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{++}$ . Con respecto a los receptores que median esta acción, Choi y col., (1986; 1988) mencionan la participación del receptor a N-metil-D-aspartato (NMDA) ya que el bloqueo de esta clase de receptores es suficiente para atenuar marcadamente la pérdida neuronal asociada a la administración del GMS. Por otro lado, Frandsen y col., (1989) han propuesto la participación de receptores no NMDA, en estudios a través del desarrollo de nuevos antagonistas (Honoré y col., 1988; Frandsen y col., 1990; Michaels y Rothman, 1990).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Glu en forma de sal monosódica (GMS) se ha utilizado ampliamente, por sus efectos neurotóxicos, en estudios neuroquímicos, fisiológicos, endocrinológicos y conductuales (Dawson y Lorden, 1981; Nemeroff y col., 1978; Pizzi y Barnhart, 1976; Lorden y Caudie, 1986).

En general se conoce que los animales neonatos son más susceptibles que los adultos al efecto neurotóxico del L-GMS, sin embargo no se han realizado estudios para evaluar el efecto de éste sobre el desarrollo del sistema colinérgico en particular, por lo que el presente trabajo busca obtener información acerca del efecto del L-GMS sobre la actividad de la CAT en el SNC, ya que el sistema colinérgico está ampliamente distribuido e implicado en una gran variedad de funciones tanto operativas como de integración y tiene una estrecha interacción con el sistema glutamatérgico en diferentes regiones del SNC.

## HIPOTESIS

Si el efecto citotóxico producido por el L-GMS afecta a las neuronas colinérgicas del cerebro, luego entonces, la actividad de la CAT (EC 2.3.1.6), el marcador colinérgico más específico, se verá reducida en las principales regiones ricas en estructuras colinérgicas tales como: corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo y núcleos basales de Meynert.

## OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar en forma diferencial la actividad de la CAT en diferentes regiones del SNC en ratas tratadas neonatalmente con L-GMS, y en ratas control tratadas con SENaCl.

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar la actividad de la CAT en corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo y núcleos basales de Meynert en ratas de la cepa Wistar a las edades de 7, 14 y 21 días después del tratamiento neonatal con L-GMS a una dosis de 4 mg/g de peso.

2. Determinar la actividad de la CAT en las mismas regiones y bajo el mismo esquema mencionado anteriormente, con la aplicación de solución salina en una concentración equimolar de cloruro de sodio a la del L-GMS. Estos grupos serán tomados como controles.

## MATERIAL Y METODOS

## ANIMALES

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

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente se trabajó con dos camadas de ratas recién nacidas, una de las cuales se tomó como grupo experimental y la otra como grupo control. Al grupo experimental se le administró L-GMS por vía subcutánea, a una dosis de 4 mg/g de peso en un volumen de 200  $\mu$ l de agua desionizada, esto en los días posnatales 1, 3, 5 y 7. Al grupo control se le administró una solución de cloruro de sodio en una concentración equimolar a la del L-GMS. Los animales de ambos grupos fueron sacrificados a la edad de 7 días. Posteriormente se tomaron otras camadas y se siguió el mismo esquema mencionado anteriormente, variando solo las edades de sacrificio de los animales que fueron de 14 y 21 días.

## PREPARACION DEL TEJIDO

Una vez que los animales cumplieron la edad preestablecida fueron sacrificados por decapitación y sus cerebros fueron inmediatamente removidos y disectados en frío (4°C) para obtener las siguientes regiones: corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo y núcleos basales de Meynert. Enseguida el tejido fué homogenizado en 1 ml de una solución de sacarosa 0.25 M (4°C) y luego congelado y mantenido por debajo de 0 °C para su posterior procesamiento.

## DETERMINACION DE LA CAT

La actividad de la CAT fué determinada por el método de Fonnum (1975). Para iniciar el ensayo las muestras fueron descongeladas y luego diluidas (para obtener una concentración final de proteína de 2.7 a 3.0  $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ ) en una solución de sacarosa 0.25 M conteniendo Tritón X-100 al 0.2 %.

Posteriormente se agregaron 15  $\mu\text{l}$  de cada muestra de tejido en tubos de 4 mm de diámetro colocados en una mezcla de hielo-agua, y la reacción fué iniciada por la adición de 15  $\mu\text{l}$  del medio de incubación conteniendo: [ $^{14}\text{C}$ ] acetyl CoA 14  $\mu\text{M}$  (act. esp. 56 mCi/mmol), KCl 2 M, cloruro de colina 200 mM, EDTA 4 mM, eserina 1 mM, albúmina de suero de bovino 10 mg/ml, amortiguador de fosfato de sodio 200 mM, pH 7.4.

Cada tubo fué transferido a un baño maría a 37 °C donde se incubó por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo las muestras fueron retiradas e inmediatamente lavadas con 2 ml de amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, y con un pH 7.4 para detener la reacción. Luego se pasó el contenido de los tubos a viales los cuales contenían 1 ml de Kalignost/acetonitrilo (250 mg/ 50 ml) y enseguida les fueron agregados 5 ml de tolueno puro.

A continuación, los viales fueron agitados durante 30 segundos para separar las dos fases. Luego se tomaron con una pipeta 2 ml de la fase orgánica (superior) y fueron colocados en otro vial al cual se agregaron 5 ml de líquido de centelleo para finalmente cuantificar la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000.

La actividad de la CAT se expresa como pMoles de acetilcolina formada por mg de proteína por hora. La actividad inespecífica se midió con un testigo que contenía 15  $\mu$ l de sacarosa 0.25 M y 15  $\mu$ l del medio de incubación. La determinación de proteínas fué realizada por el método de Lowry y col., (1951), utilizando albúmina de suero de bovino como estándar. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se evaluaron tomando en consideración las pruebas paramétricas t-student de dos colas y análisis de varianza (ANOVA) por comparación de variables independientes.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL

RATAS  
RECIEN NACIDAS  
(CEPA WISTAR)



TRATAMIENTO NEONATAL  
(INYECCION SUBCUTANEA DIAS 1, 3, 5 Y 7 POSNATALES)

GRUPOS  
EXPERIMENTALES

GLUTAMATO MONOSODICO

(GMS)

4 mg/g C/DOSIS

GRUPOS  
CONTROLES

SOLUCION EQUIMOLAR NaCl

(SE NaCl)

1.38 mg/g C/DOSIS



SACRIFICIO POR DECAPITACION

(A LAS EDADES DE 7, 14 Y 21 DIAS)



OBTENCION DE:

CORTEZA FRONTAL

CUERPO ESTRIADO

HIPOCAMPD

NUCLEOS DE MEYNERT



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD  
DE LA CAT (EC 2.3.1.6)

## RESULTADOS

## EFFECTOS DEL L-GMS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CAT

A continuación se presentan por regiones los resultados obtenidos en la actividad de la CAT a las edades de 7, 14 y 21 días.

### CORTEZA FRONTAL

A las edades de 7 y 14 días no se presentan diferencias en la actividad de la CAT entre los grupos controles y experimentales. Sin embargo en los animales de 21 días se observa una disminución estadísticamente significativa en el grupo experimental (con L-GMS) con respecto al grupo control (con SENaCl), los valores fueron de  $3939 \pm 2103$  pMoles/mg prot/h y  $6542 \pm 3231$  pMoles/mg prot/h respectivamente, esto representa una disminución del 40 %. Los resultados se muestran en la tabla 1 y la gráfica 1.

### CUERPO ESTRIADO

En esta región no encontramos diferencias a la edad de 7 días, sin embargo a la edad de 14 días el grupo experimental muestra una disminución significativa en la actividad de la CAT del 27 % con respecto al grupo control ( $15619 \pm 1882$  vs  $21336 \pm 3287$  pMoles/mg prot/h respectivamente), de manera similar, el grupo experimental de 21 días presenta una disminución significativa del 29 % con respecto al grupo control ( $15617 \pm 3580$  vs  $22081 \pm 4140$  pMoles/mg prot/h respectivamente). Los resultados se aprecian en la tabla 1 y la gráfica 2.

### HIPOCAMPO

En esta región no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la CAT entre los grupos controles y

experimentales en ninguna de las edades estudiadas. Los resultados se muestran en la tabla 1 y la gráfica 3.

#### NUCLEOS BASALES DE MEYNERT

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de la CAT entre los grupos controles y experimentales en ninguna de las edades estudiadas. Los resultados se observan en la tabla 1 y la gráfica 4.

## DISCUSSION

Se ha demostrado que el GMS induce degeneración neuronal en la retina y en el hipotálamo en roedores y primates neonatos después de la administración oral o subcutánea (Lucas y Newhouse, 1957; Everly, 1971). El análisis microscópico de estas lesiones revela que sólo las dendritas y los cuerpos celulares de las neuronas intrínsecas son afectadas por el GMS, mientras que las terminales nerviosas de neuronas extrínsecas o fibras mielinizadas que pasan a través del área lesionada sobreviven (Everly, 1971; Olney, 1971). Recientemente en nuestro laboratorio hemos encontrado evidencia histológica de daño celular inducido por la administración neonatal de GMS bajo el esquema aquí estudiado. Algunas de las regiones afectadas son: corteza frontal, cuerpo estriado y el hipocampo en grados y edades diferentes. Pensamos que las neuronas afectadas sean principalmente interneuronas colinérgicas en dichas regiones por lo que buscamos evidencias al respecto (Beas-Zárate y col., 1990a,b).

En general, se conoce que los animales neonatos son más sensibles al efecto citotóxico del L-GMS que los adultos, esto debido a que no existe barrera hematoencefálica (BHE) y posiblemente también debido a que los sistemas cerebrales de inactivación del glu (fundamentalmente la captura de glu por las células gliales) no están completamente desarrollados (Olney, 1971).

En los experimentos realizados en este trabajo se observó una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la CAT en los grupos experimentales (con L-GMS) con respecto a los controles (con SE NaCl) en dos de las cuatro regiones estudiadas.

En la corteza se presenta una disminución del 40 % a la edad de 21 días, mientras que en el cuerpo estriado se presenta una disminución del 27 % a la edad de 14 días y del 29 % a la edad de 21 días. Estos resultados sugieren que el L-GMS administrado neonatalmente en ratas ejerce un efecto citotóxico sobre las neuronas colinérgicas (interneuronas) de la corteza y el cuerpo estriado ya que las modificaciones observadas en la actividad de la CAT apoyan esta idea. Además se observa que el efecto no es inmediato sino que ocurre posteriormente en el desarrollo ya que inicia después de los 14 días en corteza y entre los 7 y 14 en el cuerpo estriado.

Se ha estudiado la implicación de la glutamina y las células gliales en la modulación de la neurotoxicidad del L-GMS, y se ha observado que en cultivos de células neuronales (SC9) en un medio con bajas concentraciones de glutamina ( $<0.5$  mM), el L-GMS no tiene ningún efecto citotóxico, sino que incluso ejerce un efecto promotor del crecimiento, además se ha encontrado que estas células son más susceptibles al efecto citotóxico del L-GMS cuando son cultivadas junto con células gliales (WC5) que cuando se cultivan en forma aislada (Simantov, 1989).

Partiendo de lo anterior, podemos interpretar nuestros resultados con base en el desarrollo de las células gliales, que como ya se mencionó, se establecen completamente durante la etapa posnatal. De esta manera, el daño que se observa en las neuronas colinérgicas (interneuronas) de la corteza y el cuerpo estriado no es inmediato debido posiblemente a las bajas concentraciones de glutamina, en la

medida en que se desarrollan las células gliales, estas capturan el glutamato y lo transforman en glutamina, en un momento determinado los niveles de glutamina son suficientes para que el glutamato (todavía en exceso) induzca su efecto citotóxico.

Un importante estudio sobre el desarrollo, indica que el ácido kainico (el análogo más potente del glutamato) es neurotóxico para las neuronas estriatales en ratas de 21 días pero no en ratas de 7 días (Campochiaro y Coyle, 1978). Lo anterior coincide con nuestras observaciones y puede también reflejar el posterior desarrollo de las células gliales.

Si bien se ha observado la participación de la glutamina y las células gliales en la modulación de la neurotoxicidad del L-GMS, estos estudios se han hecho *in vitro* (Simantov, 1989), y aunque algunas observaciones *in vivo* (Campochiaro y Coyle, 1978) parecen coincidir, es necesario hacer una evaluación más amplia al respecto, ya que las células gliales constituyen el principal sistema cerebral de recaptura del glu, y en los animales adultos representan un importante mecanismo de protección (Olney, 1971).

El mecanismo del daño que hemos encontrado en estas regiones (Beas-Zárate y col., 1990a,b) puede explicarse en base a ciertas evidencias. Recientemente se ha propuesto la participación del óxido nítrico en la neurotoxicidad inducida por el glu, se ha demostrado que la activación de los receptores NMDA se asocia con un incremento en la permeabilidad al  $Ca^{++}$ , y que la elevación del  $Ca^{++}$  citosólico provoca desajustes importantes en algunas funciones celulares tales como el

metabolismo de los fosfolípidos lo cual puede llevar a la generación de ácido araquidónico, y por otra parte se ha observado también que los iones  $Ca^{++}$  se unan a una calmodulina la cual activa la enzima óxido nítrico sintetasa que convierte la arginina en citrulina y óxido nítrico. Tanto el óxido nítrico como el ácido araquidónico pueden difundir fuera de la célula y actuar sobre la terminal presináptica incrementando la liberación del neurotransmisor, cerrándose así un círculo de retroalimentación positiva que mantiene la sobrestimulación de los receptores NMDA conduciendo finalmente a la degeneración celular (Fazeli, 1992; Solomon y Bredt, 1992).

En el hipocampo, no se observan diferencias significativas en la actividad de la CAT entre los grupos controles y experimentales, lo cual sugiere una menor sensibilidad (al menos durante el desarrollo temprano) al efecto citotóxico del L-GMS por parte de las neuronas colinérgicas en esta región. Es importante estudiar si este efecto se observa en edades posteriores e identificar los tipos de receptores implicados (estudio planteado para desarrollarse a mediano plazo).

Con respecto a los núcleos de Meynert, esta región se incluyó básicamente como referencia debido a su escasa o nula interacción con el sistema glutamatérgico, además de que en ella encontramos básicamente cuerpos neuronales y no terminales colinérgicas que es donde se concentra la enzima a nivel subcelular, esto explica el hecho de que en esta región se observan los valores más bajos en la actividad de la CAT a la edad de 21 días. Además, es necesario destacar la dificultad que existe para obtener esta región en forma aislada, por lo que las variaciones observadas pueden atribuirse, en parte, a esta situación.

En nuestro laboratorio se ha determinado (paralelamente a la determinación de la actividad de la CAT) la unión específica de [3H] QNB como ligando a receptores muscarínicos, encontrándose un incremento sustancial en la cantidad de receptores a partir de los 7 días de edad en corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo (Ortuño y col., 1991) lo cual apoya nuestros resultados.

Por último, consideramos que es necesario complementar estos estudios evaluando el efecto del tratamiento neonatal con L-GMS en las edades de 30, 60 y 90 días, con el fin de conocer en la etapa adulta la respuesta del sistema colinérgico bajo estas condiciones. Será interesante conocer si posteriormente se presenta alguna recuperación en el daño inducido por el L-GMS, ya que la presencia de mecanismos de compensación es una posibilidad, y esta podría darse a nivel de un incremento en el número de receptores.

## CONCLUSIONES

1. La disminución en la actividad de la CAT inducida por la administración neonatal de GMS en dosis de 4 mg/g de peso sugiere un efecto citotóxico sobre las neuronas colinérgicas de la corteza frontal y el cuerpo estriado.

2. El efecto del L-GMS no es inmediato sino que al parecer ocurre posteriormente, inicia después de los 14 días en corteza y entre los 7 y 14 en el cuerpo estriado, este hecho puede estar relacionado con el desarrollo de las células gliales en el cerebro.

3. Aparentemente, las neuronas colinérgicas del hipocampo presentan una menor sensibilidad al efecto citotóxico del L-GMS en las primeras etapas del desarrollo.

4. La implicación de las células gliales en la neurotoxicidad del glu deberá evaluarse ampliamente, sobre todo en las primeras etapas del desarrollo, ya que, si en los animales adultos representan un mecanismo de protección, durante el desarrollo temprano parecen mediar el daño inducido por el glu.

5. Es necesario continuar con estos estudios a fin de conocer en la etapa adulta la respuesta del sistema colinérgico bajo estas condiciones.

## BIBLIOGRAFIA

- Arauz-Contreras, J, y Feria-Velasco, A. (1984). Monosodium L-glutamate induced convulsions. Differences in seizure pattern and duration of effect as a function of age in rats. *Gen. Pharmac.* 15, 391-395.
- Armstrong, D.M., Saper, C. B., Levey, A. I., Wainer, B. H., y Terry, R. D. (1983). Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *Journal of Comparative Neurology* 216, 53-68.
- Arpagaus, M. y Toutant, J. P. (1985). Polymorphism of acetylcholinesterase in adult *Pieris brassicae* heads. Evidence for detergent-insensitive and Triton X-100 interacting forms. *Neurochem. Int.* 7, 793-804.
- Beas-Zárate, C., Ortuño, S.D., Morales, V.A., Ortiz, G.G. y Feria-Velasco, A. (1990a). Changes in morphological and muscarinic receptor binding under neonatal monosodium L-glutamate treatment of rats on different brain areas. 8th Biennial meeting. *Inter. Soc. Dev. Neurosci. Abst.*, Bal, Harbor, FL. p. 166.
- Beas-Zárate, C., Ortuño, S.D., Ortiz, G.G., Morales-Villagrán, A. y Feria-Velasco, A. (1990b). Cambios morfológicos en hipocampo y corteza cerebral inducidos por la administración sistémica del glutamato en la etapa perinatal de la rata. XXXIII Cong Nac Cs Fisiol. México. C.166.
- Belzunces, P., Toutant, J. P., y Bounias, M. (1988). Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. *J. Neurochem.* 255, 463-470.
- Bhagavan, H. N., Coursin, D. B., y Stewart, C. N. (1971). Monosodium glutamate induces convulsive disorders in rats. *Nature Lond.* 232, 275-276.
- Brauth, S. E., Kitt, C. A., Price, D. L., y Wainer, B. H. (1985). Cholinergic neurons in the telencephalon of the reptile *Caiman crocodylus*. *Neuroscience Letters* 58, 235-40.

- Campocharo, P., y Coyle, J. T. (1978). Ontogenetic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutamatergic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2025-2029.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., y Roth, R. H. (1982). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Fourth edition. Oxford University Press. U.S.A. pp. 77-108.
- Craig, C. R., y Colasanti, B. K. (1987). Experimental Epilepsy Induced by Direct Topical Placement of Chemical Agents on the Cerebral Cortex. En: *Neurotransmitters and Epilepsy*. (P. C. Jobe y H. E. Laird, II, eds.). Humana, Clifton, New Jersey. pp. 191-214.
- Crawford, G. D., Correa, L., y Salvaterra, P. M. (1982). Interaction of monoclonal antibodies with mammalian choline acetyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 79, 7031-5.
- Changeux, J.P., Deviliers-Thierry, A., y Chemuivilli, P. (1984). Acetylcholine receptor: An allosteric protein. *Science* 25, 1335-1345.
- Choi, D. W. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett.* 58, 293-297.
- Choi, D. W., Peters, S., y Yokoyama, M. (1986). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is attenuated by NMDA receptor antagonists. *Soc. Neurosci. Abstr.* 12, 381.
- Choi, D. W., Koh, J. Y., y Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonist. *J. Neurosci.* 8, 185-196.
- Dale, H. H. (1914). The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J. Pharmacol.* 6, 147-190.
- Dawson, R., Jr. y Lorden, J. F. (1981). Behavioral and neurochemical effects of neonatal administration of monosodium L-glutamate in mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 95, 71-84.

- Dietz, G. W., y Salvaterra, P. M. (1980). Purification and peptide mapping of rat brain choline acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 255, 10612-10617.
- Eckenstein, F. y Thoenen, H. (1982). Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *EMBO Journal* 1, 363-8.
- Eckenstein, F. P., Baughman, R. W., y Quinn, J. (1988). An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 25, 457-74.
- Everly, J. L. (1971). Light microscopic examination of MSG-induced lesions in brain of fetal and neonatal rats. *Anat. Rec.* 169, 312.
- Faingold, C. L., (1987). Seizures Induced by Convulsant Drugs. En: *Neurotransmitters and Epilepsy*. (P. C. Jobe y H. E. Laird, II, eds.). Humana, Clifton, New Jersey. pp. 215-276.
- Fazeli, M. S., (1992). Synaptic plasticity on the trail of the retrograde messenger. *TINS*. 15, 115-117.
- Fonnum, F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24, 407-409.
- Fournier, D., Cuany, A., Bride, J. M., y Bergé, J. B. (1987). Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica*). *J. Neurochem.* 49, 1455-1461.
- Frandsen, A., Drejer, J., y Schousboe A. (1989). Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via NMDA as well as non-NMDA receptors. *Journal of Neurochem.* 53, 297-299.
- Frandsen, A., Krosggaard-Larsen, P., y Schousboe, A. (1990). Novel glutamate receptor antagonists selectively protect against kainic acid neurotoxicity in cultured cerebral cortex neurons. *Journal of Neurochem.* 55, 1821-1823.

- Hammer, R., Berrie, C. P., Birdsall, N. J. N., Burgen, A. S. V., y Hulme, E. C. (1980). Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature, Lond.* 283, 90-92.
- Hayashi, T. (1954). Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* 3, 183-192.
- Hedreen, J. C., Bacon, S. J., Cork, L. C., Kitt, C.A., Crawford, G. D., Salvaterra, F. M., y Price, D. L. (1983). Immunocytochemical identification of cholinergic neurons in the monkey central nervous system using monoclonal antibodies against choline acetyltransferase. *Neuroscience Letters* 43, 173-7.
- Henderson, Z. (1987). Overlap in the distribution of cholinergic and catecholaminergic neurons in the upper brainstem of the ferret. *Journal of Comparative Neurology* 265, 581-92.
- Heuser, J. E., y Reese, T. S. (1981). Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 88, 564.
- Hirschowitz, B. I., Hammer, R., Giachetti, A., Keirns, J. J., y Levine, R. R. (1984). Subtypes of muscarinic receptors. Elsevier, Amsterdam 103 pp.
- Honore, T., Davies, S. N., Drejer, J., Fletcher, E. J., Jacobsen, P., Lodge, D., y Nielsen, F. E. (1988). Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate antagonists. *Science* 241, 701-703.
- Hoover, D. B., Muth, E. A., y Jacobowitz, D. M. (1978). A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. *Brain Research* 153, 295-306.
- Ichikawa, T. e Hirata, Y. (1986). Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the forebrain of the rat. *Journal of Neuroscience* 6, 281-92.
- Ishida, I., Ichikawa, T., y Deguchi, T. (1987). Monoclonal antibodies to and immunoaffinity purification of choline acetyltransferase from bovine brain. *Journal of Neurochemistry* 49, 933-8.

- Itoh, N., Slemmon, R., Hauke, D., Williamson, R., y Morita, E. (1986). Cloning of *Drosophila* choline acetyltransferase cDNA. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4081-4085.
- Jacobowitz, D. M. (1977). Histochemical and micropunch analysis of aminergic and cholinergic pathways. En: *Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum*, 10th International Congress, Quebec.
- Jancsó, G., Karcsú, S., Kiraly, E., Szebent, A., Tóth, L., Bácsy, E., Joó, F., y Párducz A. (1984). Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Research* 295, 211-216.
- Johnson, C. D. y Epstein, M. L. (1986). Monoclonal antibodies and polyvalent antiserum to chicken choline acetyltransferase. *Journal of Neurochemistry* 46, 968-76.
- Johnston, C. D., y Russel, R. D. (1983). Multiple molecular forms of acetylcholinesterase in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* 41, 30-46.
- Johnston, G. A. R. (1973). Convulsions induced in 10-day-old rats by intraperitoneal injection of monosodium glutamate and related excitant amino acids. *Biochem. Pharmac.* 22, 137-140.
- Jope, R. (1979). High affinity choline uptake and acetylcholine production in brain. Role in regulation of ACh synthesis. *Brain Res. Rev.* 1, 313-344.
- Karnovsky, M. J., y Roots, L. (1964). A direct-coloring thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 219-21.
- Koelle, G. B., y Friedenwald, J. S. (1949). A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 70, 617-22.
- Koelle, G. B. (1963). Cytological distributions and physiological functions of cholinesterases. En: O. Eichler y A. Farah (Eds.), *Handb. exp. Pharmak.*, Vol. 15, Springer-Verlag, Heidelberg.

- Köhler, C., y Schwarcz, R. (1981). Monosodium glutamate: increased neurotoxicity after removal of neuronal re-uptake sites. *Brain Research* 211, 485-491.
- Kravitz, F. A., Slater, C. R., Takahashi, K., Bownds, M. D., y Grossfeld, R. M. (1970). Excitatory transmission in invertebrates. En: *Excitatory Synaptic Mechanism*. (Anderson, P., y Jansen, J. K. S., Eds.), Universitetsforlaget, Oslo, pp. 85-93.
- Krebs, H. A. (1935). Metabolism of amino acids. IV. Synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissue. *Biochem. J.* 29, 1951-1969.
- Kuffler, S. W., Nicholls, J., y Martin, R. A. (1984). *From Neuron to Brain: A Cellular Approach to the Function of the Nervous System*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.
- Kuhar, M. J. (1976). The anatomy of cholinergic neurons. En *Biology of Cholinergic Function* (eds. A. M. Goldberg y Hanin, I.), pp. 3-27. Raven Press, New York.
- Kvamme, E., y Olsen, B. E. (1980). Substrate mediated regulation of phosphate-activated glutaminase in nervous tissue. *Brain Research* 181, 228-233.
- Levey, A. I., Aoki, M., Fitch, F., y Wainer, B. H. (1981). The production of monoclonal antibodies reactive with bovine choline acetyltransferase. *Brain Research* 218, 383-7.
- Levey, A. I., Wainer, B. H., Mufson, E. J., y Mesulam, M. M. (1983a) Co-localization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat cerebrum. *Neuroscience* 9, 9-22.
- Levey, A. I., Armstrong, D. M., Atweh, S. F., Terry, R. D., y Wainer, B. H. (1983b). Monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: production, specificity, and immunohistochemistry. *Journal of Neuroscience* 3, 1-9.

- Lewis, P. R., y Shute, C. C. D. (1967). The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic organ and supra-optic crest. *Brain* 90, 521-40.
- Lorden, F. J., y Caudle, A. (1986). Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 8, 509-519.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lucas, D. R., y Newhouse, J. P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58, 193-201.
- Maley, B. E., Frick, M. L., Levey, A. I., Wainer, B. H., y Elde, R. P. (1988). Himmunohistochemistry of choline acetyltransferase in the guinea pig brain. *Neuroscience Letters* 84, 137-42.
- Massoulie, J., y Bon, S. (1982). Acetylcholinesterase. *Annu. Rev. Neurosci* 5, 57-106.
- Maynert, E. W., Marczyinski, T. J., y Browning, R. A. (1975). The role of the neurotransmitters in the epilepsies. *Adv. Neurol.* 13, 79-147.
- McGeer, P. L., y McGeer, E. G. (1989). Amino acid neurotransmitters. En: *Basic neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects.* (Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., y Molinoff, P. B., eds). Fourth edition. Raven Press, New York. pp. 311-332.
- McLennan, H. (1981). On the nature of the receptors for various excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 27, 283-262.

- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Levey, A. I., y Wainer, B. H. (1983a). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology* 214, 170-97.
- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H., y Levey, A. I. (1983b). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10, 1185-201.
- Michaels, R. L., y Rothman, S. M. (1990). Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. of Neurosci.* 10, 283-292.
- Mufson, E. J., Desan, P. H., Mesulam, M. M., Wainer, B. H., y Levey, A. I. (1984). Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the forebrain of the red-eared pond turtle (*Pseudemys scripta elegans*). *Brain Research* 323, 103-8.
- Nachmansohn, D. y Machado, A. L. (1943). The formation the acetylcholine. A new enzyme: choline acetylase. *Journal of Neurophysiology* 6, 397-403.
- Nagai, T., Pearson, F., Peng, F., y McGeer, P. L. (1983). Immunohistochemical staining of the human forebrain with monoclonal antibody to human choline acetyltransferase. *Brain Research* 265, 300-6.
- Nemeroff, C. B., Lipton, M. A., y Kizer, J. S. (1978). Models of neuroendocrine regulation: use of MSG as an investigational tool. *Dev. Neurosci.* 1, 102-109.
- Nemeroff, Ch. B., y Crisley, F. D. (1975). Monosodium L-glutamate induced convulsions: Temporary alteration in blood-brain barrier permeability to plasma proteins. *Envir. Physiol. Biochem.* 5, 389-395.
- Numa, S., Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosoto, M., y col. (1983). Molecular structure of the acetylcholine receptor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48, 57-69.

- Olney, J. W. (1971). Glutamate induced necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 30, 75-90.
- Olney, J. W. (1974). Toxic effects of glutamate and related amino acids on the developing central nervous system. En: *Heritable Disorders of Amino Acid Metabolism.* (Nyhan, W. L. Ed.), John Wiley, New York. pp. 501-512.
- Olney, J. W. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids. En: *Kainic Acid as Tool in Neurobiology*, edited by McGeer, E., Olney, J., y McGeer, P. New York: Raven Press. pp. 95-121.
- Olney, J. W. (1980). Excitatory neurotoxins as food additives: an evaluation of risk. *Neurotoxicology* 2, 153-192.
- Olney, J. W., Labruyere, J., Collins, J. F., y Curry, K. (1981). D-aminophosphonovalerato is 100-fold more powerful than D-alpha-amino adipate in blocking N methylaspartate neurotoxicity. *Brain Res.* 221, 207-210.
- Olney, J. W., Price, M. T., Samson, L., y Labruyere, J. (1986). The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neuroscience Letters* 65, 65-71.
- Ortuño, S. D., Beas-Zárate, C., Guzmán, G. G., Garza B.F., Rivera C.M. Morales V. A., y Feria, V. A. (1991). Efecto del L-GMS administrado neonatalmente sobre el desarrollo del sistema colinérgico de la rata. XXXIV Cong Nac Cs Fisiol. México. C. 54.
- Pizzi, W. J., y Barnhart, W. J. (1976). Effects of monosodium glutamate on somatic development obesity, and activity in the mouse. *Pharmacol. Biochem Behav.* 5, 551-557.
- Rama-Sastry, B. V., y Sadavongvivad, C. (1979). Non-neuronal acetylcholine. *Pharmacol. Rev.* 30, 65-132.
- Rossier, J. (1975). Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase: real or artifact? *Brain Research* 98, 619-622.

- Rossier, J. (1981). Serum monospecificity: A prerequisite for reliable immunohistochemical localization of neuronal markers including choline acetyltransferase. *Neuroscience* 6, 989-991.
- Rubio-Donnadieu, F. (1986). Generalidades y clasificación de la epilepsia. En: *Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario*. (Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D., y Rubio-Donnadieu, F., eds). Primera edición. Trillas, México. pp. 19-27.
- Rye, D. B., Wainer B. H., Mesulam, M. M., Mufson, E. J., y Saper, C. B. (1984). Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience* 13, 627-43.
- Sandoval, M. E., y Torner-Aguilar, C. (1986). Neurotransmisión y epilepsia. En: *Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario*. (Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D., y Rubio-Donnadieu, F., eds). Primera edición. Trillas, México. pp. 98-139.
- Saper, C. B. (1984). Organization of cerebral cortical afferent system in the rat. I. Magnocellular basal nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 222, 313-42.
- Schwarcz, R., Köehler, C., Mangano, R. M. y Neophytides, A. N. (1981). En: *Glutamate as a neurotransmitter*. (Di Chiara, G., y Gessa, G. L. eds.), Raven Press. New York. pp. 403-412.
- Shute, C. C. D., y Lewis, P. R. (1967). The ascending cholinergic reticular systems: neocortical, olfactory, and subcortical projections. *Brain* 90, 497-520.
- Silver, A. (1974). *The Biology of Cholinesterases*. North-Holland, Amsterdam.
- Solis-Ortiz, H., y Arauz-Contreras, J. (1986). Modelos experimentales de epilepsia. En: *Epilepsia. Un enfoque multidisciplinario*. (Feria-Velasco, A., Martínez de Muñoz, D., y Rubio-Donnadieu, F., eds). Primera edición. Trillas, México. pp. 74-97.

- Solomon, H. S. y Brecht, D. S. (1992). Biological Roles of Nitric Oxide. *Scientific American*. Mayo 1992. 28-34.
- Storm-Mathisen, J. (1977). Localization of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model. *Progr. Neurobiol.* 8, 119-181.
- Taylor, P., y Heller, J. B. (1989). Acetylcholine. En: Basic neurochemistry. *Molecular, cellular, and medical aspects*. (Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., y Molinoff, P. B., eds). Fourth edition. Raven Press, New York. pp. 203-231.
- Vincent, S. R. y Reiner, P. B. (1987). The immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the cat brain. *Brain Research Bulletin* 18, 371-415.
- Wainer, B. H., Levey, A. I., Mufson, E. J., y Mesulam, M. M. (1984). Cholinergic systems in mammalian brain identified with antibodies against-choline acetyltransferase. *Neurochemistry International* 6, 163-82.
- Wainer, B. H., y Mesulam, M. M. (1990). Ascending cholinergic pathways in the rat brain. En: *Brain Cholinergic Systems*. (Steriade, M. y Biesold, D., eds). Oxford University Press, New York. pp. 65-119.
- Watkins, J. C. (1981). Pharmacology of excitatory amino acid receptors. En: *Glutamate: Transmitter in the Central Nervous System* (Roberts, P. J., Storm-Mathisen, J., y Johnston, G. A. R., eds), pp. 1-24. John Wiley y Sons, Chichester.
- Zingde, S., Rodrigues V., Joshi, S. M., y Krishnan K. S. (1983). Molecular properties of *Drosophila* acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 41, 1243-1252

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURA 1

### PRINCIPALES VIAS COLINÉRGICAS EN EL CEREBRO DE LA RATA

Las designaciones CH1-CH6 identifican grupos de neuronas colinérgicas contenidas dentro de varios núcleos del cerebro anterior y tronco cerebral. Abreviaciones: (AMG), amígdala; (CD), cerebelo; (CC), cuerpo calloso; (CE), cuerpo estriado; (CT), corteza; (HDB), núcleo límbico horizontal de la banda diagonal de Broca; (HC), hipocampo; (TDL), núcleo tegmental dorsolateral; (SM), núcleo medio septal; (NBM), núcleos basales de Meynert; (BO), bulbo olfatorio; (TFP), núcleo tegmental pedunculo pontino; (T), tálamo; (RT), núcleo reticular talámico; (VDB), núcleo límbico vertical de la banda diagonal de Broca. Las interneuronas colinérgicas se muestran esquemáticamente en CT, HC, y CE (Modificado e interpretado de acuerdo con Wainer y Mesulam, 1990).

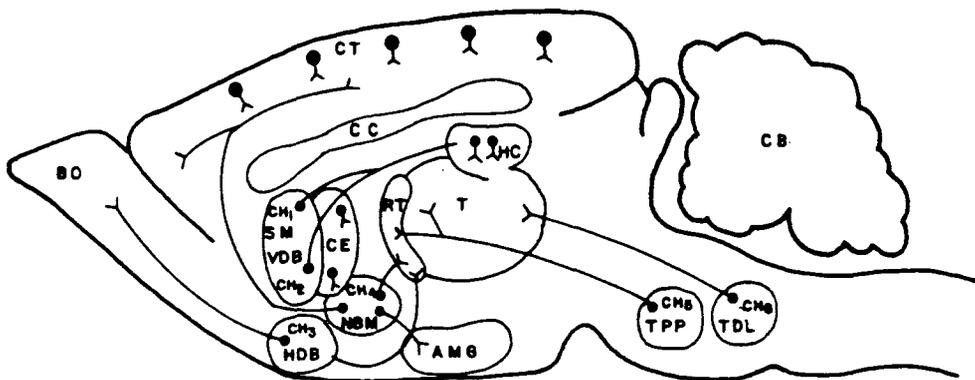


FIG. 1.

FIGURA 2  
SINTESIS Y DEGRADACION DE LA ACETILDOLINA

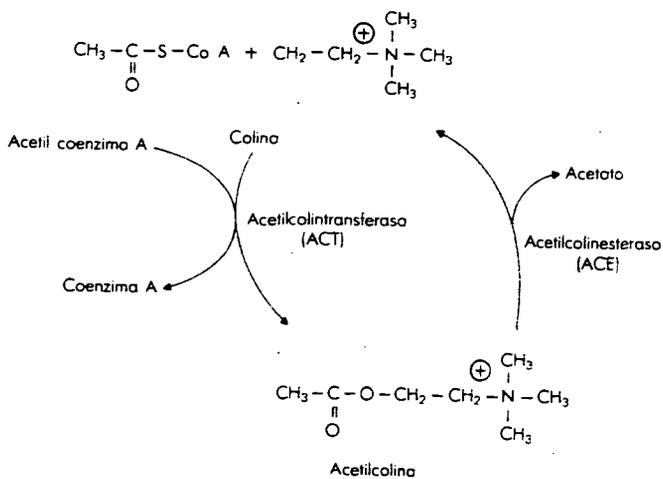


FIG. 2.

FIGURA 3  
LA TRANSMISION COLINERGICA

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

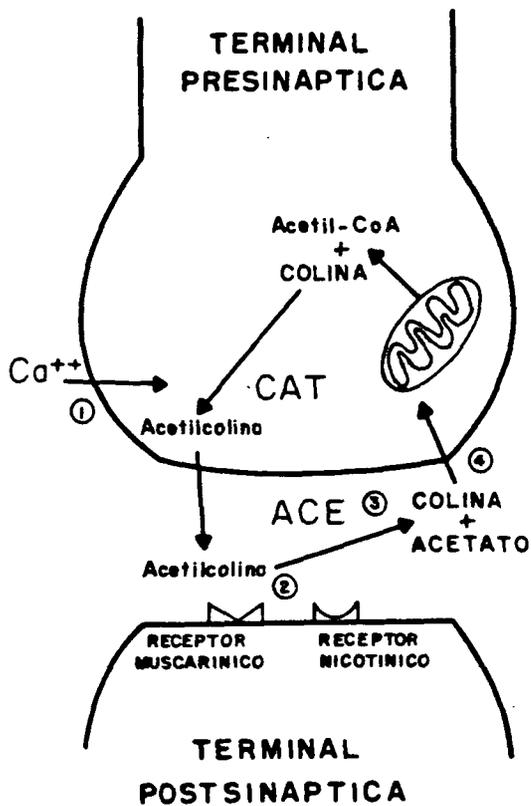
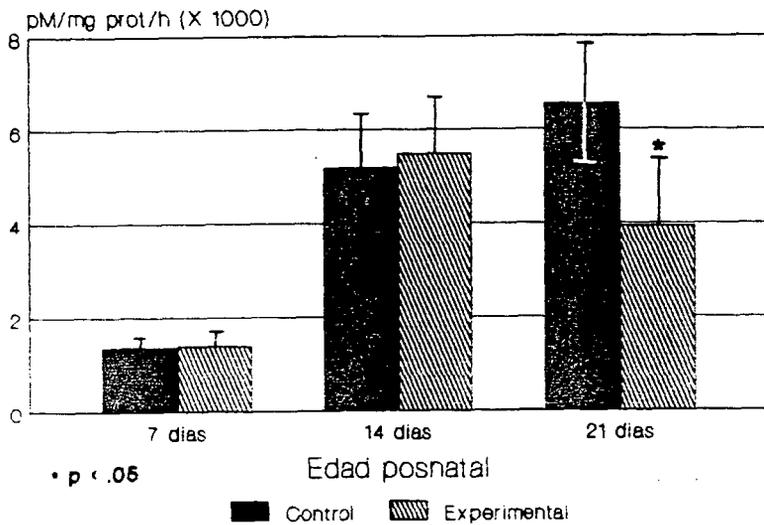


FIG. 3.

GRAFICA 1  
ACTIVIDAD DE LA CAT EN LA CORTEZA FRONTAL

En esta grafica se representa en la ordenada la actividad de la CAT expresada en pMoles/mg prot/h, y en la abcisa la edad de los animales. Los resultados expresan la media  $\pm$  desviacion estandar de 4-6 experimentos por duplicado de las variables. Abreviaciones: L-GMS, L-glutamato monosodico: SENaCl, solución de NaCl equimolar a L-GMS.

## Actividad de CAT en corteza frontal

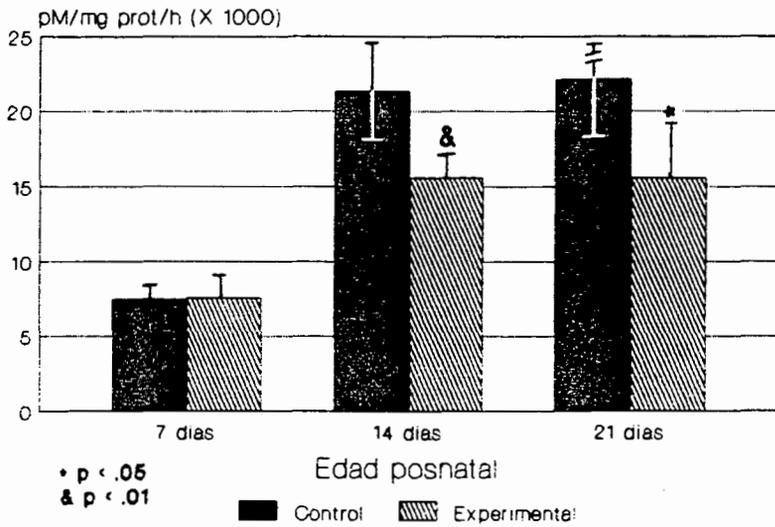


## GRAFICA 2

### ACTIVIDAD DE LA CAT EN EL CUERPO ESTRIADO

En ésta gráfica se representa en la ordenada la actividad de la CAT expresada en pMoles/mg prot/h, y en la abcisa la edad de los animales. Los resultados expresan la media  $\pm$  desviación estándar de 4-6 experimentos por duplicado de las variables. Abreviaciones: L-GMS, L-glutamato monosódico; SENaCl, solución de NaCl equimolar a L-GMS.

## Actividad de CAT en cuerpo estriado

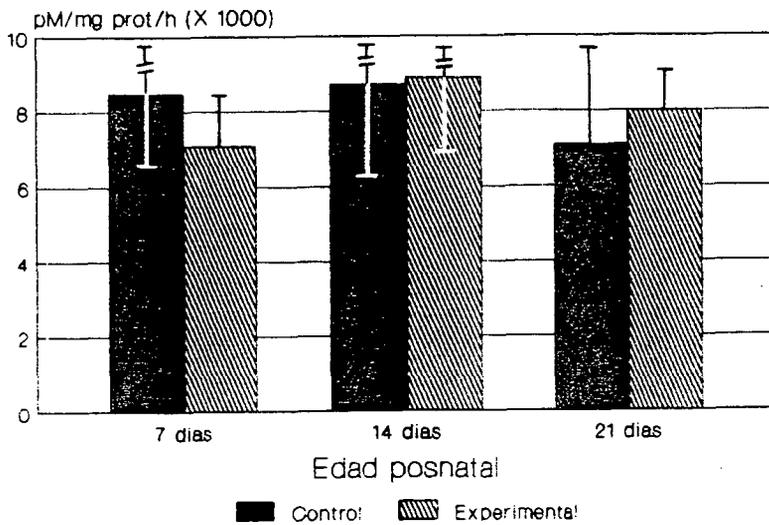


### GRAFICA 3

#### ACTIVIDAD DE LA CAT EN EL HIPOCAMPO

En ésta gráfica se representa en la ordenada la actividad de la CAT expresada en pMoles/mg prot/h, y en la abcisa la edad de los animales. Los resultados expresan la media  $\pm$  desviación estándar de 4-6 experimentos por duplicado de las variables. Abreviaciones: L-GMS, L-glutamato monosódico; SENaCl, solución de NaCl equimolar a L-GMS.

## Actividad de CAT en hipocampo



#### GRAFICA 4

#### ACTIVIDAD DE LA CAT EN LOS NUCLEOS BASALES DE MEYNERT

En esta gráfica se representa en la ordenada la actividad de la CAT expresada en pMoles/mg prot/h, y en la abcisa la edad de los animales. Los resultados expresan la media  $\pm$  desviación estándar de 4-6 experimentos por duplicado de las variables. Abreviaciones: L-GMS, L-glutamato monosódico; SENaCl, solución de NaCl equimolar a L-GMS.

## Actividad de CAT en Nucleos de Meynert

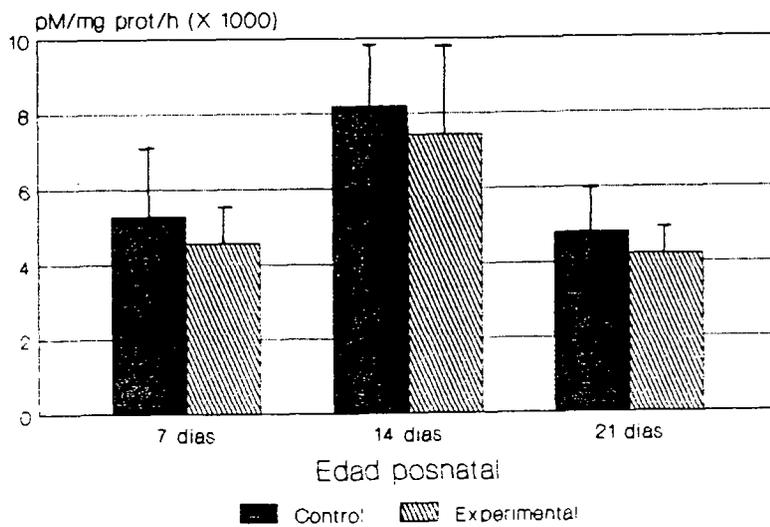


TABLA 1  
ACTIVIDAD DE LA CAT DURANTE EL DESARROLLO DE RATAS  
TRATADAS NEONATALMENTE CON L-GMS

EDAD (días)		7	14	21
CORTEZA	C	1347 ± 226 -	5184 ± 1121 -	6542 ± 3231 -
	E	1389 ± 294 (n.s)	5497 ± 1183 (n.s)	* 3939 ± 2103 (40%)
ESTRIADO	C	7433 ± 737 -	21336 ± 3287 -	22081 ± 4140 -
	E	7561 ± 1406 (n.s)	& 15619 ± 1882 (27%)	* 15617 ± 3500 (29%)
HIPOCAMPO	C	8478 ± 1946 -	3702 ± 2461 -	7030 ± 2516 -
	E	7085 ± 1471 (n.s)	8893 ± 2153 (n.s)	7998 ± 1185 (n.s)
N.B.M	C	5265 ± 1835 -	8187 ± 1636 -	4790 ± 1144 -
	E	4558 ± 991 (n.s)	7438 ± 2409 (n.s)	4214 ± 883 (n.s)

TODAS LAS CANTIDADES ESTAN EXPRESADAS EN pMoles/mg proteína/h

Abreviaciones : (n.s) = no significativo C = Grupo control

\* = p < 0.05

E = Grupo experimental

& = p < 0.01

N.B.M = Nucleos Basales de Meynert

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas



**XXXIV**  
**Congreso Nacional de**  
**Ciencias Fisiológicas**

Programa general  
y resúmenes



UNIVERSIDAD DE COLIMA

Colima, Col., septiembre 8 al 12

1991

EFFECTO DEL L-GLUTAMATO MONOSODICO (GMS) ADMINISTRADO  
NEONATALMENTE SOBRE EL DESARROLLO DEL SISTEMA  
COLINERGICO DE LA RATA.

Ortuño, S.D., Beas-Zarate, C., Guzman G.B., Rivera,  
C.M., Garza B. F., Morales V.A. Feria V.A. Facultad  
de Ciencias Biologicas, U. de G.

El GMS administrado sistemicamente produce destruccion excitotóxica neuronal en ciertas areas del SNC. de la rata, raton y otras especies por un mecanismo aun desconocido.

Los neonatos son mas susceptibles de sufrir dicha accion toxica, ya que la lesion causada depende de la dosis, via de administracion y la edad del animal. En base a lo anterior se eligio un esquema de administracion multiple subcutaneo de GMS a la dosis de 4 mg/q.de peso a los 1, 3, 5 y 7 dias posnatales para posteriormente sacrificarlos a los 7 y 14 dias de edad y se obtuvieron la corteza frontal (CF), cuerpo estriado (CE) y el hipocampo (H). Se determinó la union especifica ( $K_b$  y  $B_{max}$ ) de  $^3H$ -QNB como ligando a receptores muscarinicos, así como la actividad especifica de la CAT, para valorar la susceptibilidad de neuronas colinérgicas a los efectos neurotóxicos del GMS en las areas antes mencionadas.

Los resultados indican que a los 7 dias de edad se reduce en forma importante la afinidad del ligando en CF, y CE ( $K_b$  7-10 veces mayor), mientras que la  $B_{max}$  se incremento en CF en un 200 %. En H a los 7 dias se observo un incremento del 70 % en la  $K_b$ , mientras que la  $B_{max}$  disminuyo en un 50 %. A los 14 dias el CE presento una reduccion del 75 % en la  $K_b$  con un incremento de la  $B_{max}$  del 40 %. Por otro lado, la actividad de la CAT, sólo se incremento un 20 % en el CE a los 7 dias de edad, mientras que en las otras areas no se observo ningun cambio significativo.

Estos resultados sugieren que el efecto neurocitotóxico inducido por el GMS es mediado, en parte, por el sistema colinérgico.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección .....  
Expediente .....  
Número .....

**C. FRANCISCO GARZA BRISEÑO**  
**P R E S E N T E . -**

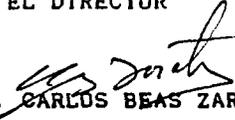
Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis " DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINA ACETILTRANSFERASA (EC 2.3.1.6) EN EL CEREBRO DE RATAS TRATADAS NEONATALMENTE CON L- GLUTAMATO MONOSODICO " para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Director de dicha Tesis el Biol. Daniel -- Ortuño Sahagún.

**A T E N T A M E N T E**  
**" PIENSA Y TRABAJA "**  
**AÑO "LIC. JOSE GUADALUPE ZUNO HERNANDEZ"**  
**Guadalajara, Jal., 09 Diciembre de 1991.**  
**EL DIRECTOR**



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C.  **CARLOS BEAS ZARATE**

**EL SECRETARIO**



M. EN C. **MARTÍN PEDRO TENA MEZA**

c.c.p.- El Biol. Daniel Ortuño Sahagún, Director de Tesis.pte.-  
c.c.p.- El expediente del alumno.  
CBZ>MPTM>CgIr.

Al contestar este oficio citese fecha y número

# Laboratorio de Neuroquímica

Facultad de Ciencias Biológicas  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

M. en C. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS

DIRECTOR DE LA FACULTAD  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T E :

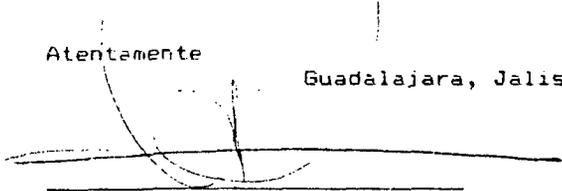
Por medio de este conducto me es grato saludarle y a la vez comunicarle que el trabajo de tesis titulado: "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINA ACETILTRANSFERASA (E.C. 2.3.1.6) EN EL CEREBRO DE RATAS TRATADAS NEONATALMENTE CON L-GLUTAMATO MONOSODICO" desarrollado por el C. pasante de la Licenciatura en Biología FRANCISCO GARZA BRISEÑO, ha quedado debidamente concluido.

Se anexan a la presente ejemplares del escrito para su revisión y en su caso aprobación para la impresión del mismo, con el fin de programar fecha de examen de Tesis Profesional.

Sin otro particular, le reitero la expresión de mi consideración mas distinguida.

Atentamente

Guadalajara, Jalisco a 4 de Junio de 1992.

  
Biólogo Daniel Ortuño Sahagún

Director de la Tesis.

ccp Sinodales de evaluación de proyecto.  
ccp C. pasante de la Licenciatura en Biología  
Francisco Garza Briseño.