UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Regulación del Número de Receptores Muscarinicos en algunas Areas de Cerebro de Rata durante un Aprendizaje Instrumental

T E S I S

Que para Obtener el Título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

P r e s e n t a :

ARTURO ORTEGA SOTO

MEXICO, D. F. 1985

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

I/ INTRODUCCION 1

2/ MATERIALES Y METODOS, 11

SUJETOS, 11

CONDICIONAMIENTO OPERANTE, 11

SACRIFICIO Y DISECCION, 12

PREPARACION DE LA FRACCION SINAPTOSOMAL CRUDA, 13

TECNICA DE LA UNION DEL LIGANDO ESPECIFICO AL RECEPTOR MUSCARINICO, 13

3/ RESULTADOS, 15

CONDUCTUALES, 15

BIOQUIMICOS, 19

4/ DISCUSION, 27

5/ CONCLUSIONES, 31

6/ BIBLIOGRAFIA, 33

I/ INTRODUCCION.

Los avances de la genética molecular han producido una considerable evidencia de que la información hereditaria se encuentra almacenada en un código químico, la molécula de ácido desoxirribonucléico (ADN). Debido a ello, muchos autores, desde Monné (1948) y Katz (1950), han postulado que la información adquirida puede también estar almacenada químicamente.

El problema de la adquisición de información por el cerebro, nos lleva a una discusión preliminar de los conceptos de aprendizaje y memoria. No existe, un acuerdo general entre los psicólogos acerca de una definición de estos términos. De cualquier forma, no parece ser necesario aquí discutir estas definiciones a fondo, y en el contexto del presente trabajo uno puede simplemente definir el aprendizaje como la adquisición, integración y retención de información por el cerebro, y memoria como la suma de toda la información almacenada por el sistema nervioso central.

Se pueden distinguir dos tipos fundamentales de aprendizaje:

1. Condicionamiento Clásico.- se le llama también Pavloviano, en él, un estímulo neutro, tal como un sonido, es presentado inmediatamente antes que un estímulo que produce una respuesta natural en el organismo, por ejemplo la presentación de comida que resulta en una respuesta de salivación. Después de un número determinado de presentaciones del par de estímulos el estímulo neutro empieza, por sí solo, a provocar una respuesta muy similar a la que produce el estímulo natural. Al estímulo natural se le llama estímulo no condicionado y a la respuesta natural se le nombra respuesta no condicionada.

I/ INTRODUCCION.

Los avances de la genética molecular han producido una considerable evidencia de que la información hereditaria se encuentra almacenada en un código químico, la molécula de ácido desoxirribonucléico (ADN). Debido a ello, muchos autores, desde Monné (1948) y Katz (1950), han postulado que la información adquirida puede también estar almacenada químicamente.

El problema de la adquisición de información por el cerebro, nos lleva a una discusión preliminar de los conceptos de aprendizaje y memoria. No existe, un acuerdo general entre los psicólogos acerca de una definición de estos términos. De cualquier forma, no parece ser necesario aquí discutir estas definiciones a fondo, y en el contexto del presente trabajo uno puede simplemente definir el aprendizaje como la adquisición, integración y retención de información por el cerebro, y memoria como la suma de toda la información almacenada por el sistema nervioso central.

Se pueden distinguir dos tipos fundamentales de aprendizaje:

1. Condicionamiento Clásico.- se le llama también Pavloviano, en él, un estímulo neutro, tal como un sonido, es presentado inmediatamente antes que un estímulo que produce una respuesta natural en el organismo, por ejemplo la presentación de comida que resulta en una respuesta de salivación. Después de un número determinado de presentaciones del par de estímulos el estímulo neutro empieza, por sí solo, a provocar una respuesta muy similar a la que produce el estímulo natural. Al estímulo natural se le llama estímulo no condicionado y a la respuesta natural se le nombra respuesta no condicionada.

2. Aprendizaje Operante.- es también conocido como Aprendizaje Instrumental o como Aprendizaje Estímulo-Respuesta, esto último se debe a que originalmente fué caracterizado como un simple aprendizaje de una respuesta específica a un estímulo particular. En este tipo de aprendizaje, los sujetos son inducidos a obtener un premio y a interactuar con el medio externo a fin de obtenerlo.

La idea de que el aprendizaje es el resultado de algún cambio en la conducción sináptica data desde hace tiempo (Tanzi 1893). Es una idea simple y en muchas formas obvia. De cualquier manera cierto tipo de evidencias de este fenómeno han sido determinadas recientemente gracias al empleo de drogas bloqueadoras de la transmisión sináptica (McGaugh 1973).

La transmisión interneuronal es establecida por la liberación y la subsecuente interacción de neurotransmisores químicos, los cuales son biosintetizados y almacenados en sitios específicos e inherentes a la terminal nerviosa. Un estímulo eléctrico provoca la liberación del neurotransmisor, el cual se mueve a través de la hendidura sináptica e inicia un segundo impulso en la neurona postsináptica (Axelrod 1974).

Los neurotransmisores y por tanto cierto tipo de drogas, presentan su efecto al interactuar con receptores específicos. Los receptores de los neurotransmisores son macromoléculas de naturaleza protéica, muchos de los cuales están localizados en la membrana postsináptica. Existen también receptores presinápticos o autorreceptores, los cuales

están localizados en las terminales axónicas y cuya función es controlar la liberación o el recambio del neurotransmisor por un mecanismo de retroalimentación.

Cada receptor presenta un alto grado de especificidad por un neurotransmisor determinado. Su estructura permite que exista un perfecto acoplamiento entre el neurotransmisor y el receptor, provocando así una serie de procesos químicos inherentes a la formación del complejo neurotransmisor-receptor de que se trate. Tales procesos pueden ser desde la activación de un complejo enzimático, hasta la modulación de la liberación de otros neurotransmisores, entre otros muchos.

La participación del sistema colinérgico en los procesos del aprendizaje ha sido ampliamente estudiada (Deutsch 1973, Bartus & Johnson 1976, Spencer 1983). La mayoría de los trabajos al respecto se han apoyado en el empleo de fármacos antagonistas (compuestos que bloquean la transmisión sináptica al interactuar con el receptor) a los receptores colinérgicos muscarínicos, y esto se debe a que no obstante que en el cerebro de los mamíferos también existen receptores colinérgicos del tipo nicotínico, los muscarínicos están en una mayor proporción. Además esta predominancia se presenta también en aquellas estructuras cerebrales que se sabe están directamente involucradas en el proceso del aprendizaje, tales como el hipocampo y la amígdala (Chung, 1977).

Tanto el condicionamiento clásico, como el aprendizaje instrumental se ven disminuídos si se lleva a cabo un bloqueo del sistema colinérgico muscarínico por medio de antagonistas tales como la escopolamina y la atropina (Downs 1972, Milar 1981).

Ahora bien, es importante delimitar si los efectos de esas drogas anticolinérgicas actúan, ya sea durante la adquisición y/o mantenimiento del aprendizaje, o más bien su acción reside en el deterioro de recordar o hacer consciente la información previamente almacenada en el aprendizaje.

Hasta ahora, se ha propuesto que las drogas anticolinérgicas alteran el aprendizaje al interferir o distorsionar los procesos de codificación y retención de la información almacenada por el cerebro (Spencer 1983). Luego entonces, las vías colinérgicas, y en especial las muscarínicas, desempeñan un papel importante en el aprendizaje.

Por otra parte, el hecho de que durante el aprendizaje se vea incrementada la síntesis protéica (Alemán 1982), y de que, durante este fenómeno haya un cambio en la conducción sináptica, abre la posibilidad de que estas proteínas sintetizadas de novo sean las responsables de los cambios en la conducción sináptica. En condiciones normales, las proteínas candidatos deben ser un factor limitante de la función sináptica. De acuerdo a ello, tenemos aparentemente dos posibilidades, o bien, estas proteínas son proteínas constitutivas de los canales iónicos, o bien son receptores de neurotransmisores directamente involucrados en el proceso del aprendizaje tales como la acetilcolina, la noradrenalina, y el ácido glutámico (Dunn 1980).

Reside ahí, precisamente, la importancia de conocer la cantidad de receptores muscarínicos expresados en pmol/mg de proteína en las siguientes áreas del cerebro de la rata: hipocampo, amígdala, septum, caudado y corteza tempo-parietal en condiciones de entrenamiento, sobreentrenamiento y obviamente control en un aprendizaje instrumental apetitivo.

La razón de estudiar la densidad de receptores muscarínicos en otras áreas del cerebro además de aquéllas que parecen estar íntimamente ligadas al proceso del aprendizaje, como sería el caso del hipocampo y la amígdala, obedece a que en esas regiones, además de presentarse una buena cantidad de vías colinérgicas, son áreas en las que se han encontrado cambios significativos en la síntesis protéica durante un aprendizaje instrumental (Alemán, V. no publicado).

Los estudios de receptores involucran la unión neurotransmisor marcado radiactivamente o de un análogo biológicamente activo (agonista), o de un apropiado antagonista. La unión a receptores sigue una cinética muy similar a la interacción enzima-sustrato. Para una interacción reversible ligando-receptor donde (R) es la concentración de receptor no ocupado, (L) es la concentración ligando-libre, (RL) es la concentración del complejo ligando-receptor:

$$a[R] + b[L] \underset{R_2}{\overset{R_1}{\rightleftharpoons}} c[RL] \qquad (1)$$

describe un fenómeno de unión reversible, con a, b y c, representando la estequiometría de la reacción. Al equilibrio, la velocidad de formación y de disociación del complejo ligando-receptor es la misma:

$$R\ 1[R]^a\ [L]^b = R\text{-}1\ [C]^c \qquad (2)$$

La constante de unión al equilibrio puede ser definida como una constante de asociación (Ka)

$$Ka = \frac{R_1}{R - 1} = \frac{[RL]^c}{[R]^a\ [L]^b} \qquad (3)$$

o como una constante de disociación (Kd)

$$Kd = \frac{R - 1}{R_1} = \frac{[R]^a\ [L]^b}{[RL]^c} \qquad (4)$$

La determinación de las constantes, tanto de asociación como de disociación requiere que los experimentos sean llevados a cabo en condiciones de equilibrio. Otra propiedad de las interacciones ligando-receptor es su saturabilidad, ya que existe un número finito de receptores por unidad de tejido.

El número máximo de receptores es designado como B_m.

$$[RL] + [R] = B_m$$

multiplicando por (L)

$$[RL]\ [L] + [R]\ [L] = B_m\ [L]$$

$$[RL] + \frac{[RL]}{[RL]}\ [R]\ [L] = B_m [L]$$

sustituyendo en la ecuación (4) a=b=c=1

$$[RL]\ [L] + ([RL]\ Kd) = B_m\ [L] \qquad (5)$$

$$[RL]\ ([L] + Kd) = B_m\ [L]$$

$$[RL] = \frac{B_m\ [L]}{[L] + Kd}$$

la cual es la clásica ley de la acción de las masas para la interacción enzima-sustrato, adaptada a la interacción ligando-receptor. Si ahora definimos RL como el ligando unido=B y L como el ligando libre=F, de la ecuación (5) tenemos:

$$B = \frac{B_m\ F}{F + Kd}$$

$$BF + BKd = B_m F$$

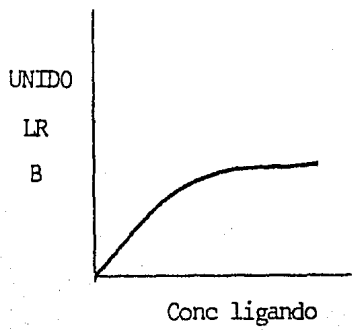
dividiendo entre F:

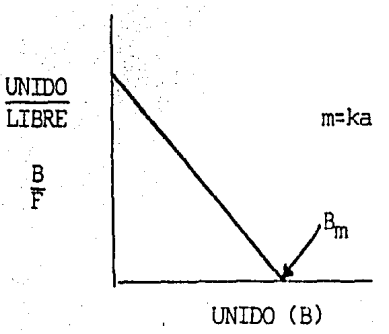
$$B + \frac{B}{F} Kd = B_m$$

rearreglando términos:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_m - B}{Kd}$$

que es la ecuación de Scatchard (1949). De tal suerte que conociendo las concentraciones de ligando unido y libre en el equilibrio, podemos determinar las constantes, tanto de asociación (ka), como de disociación (Kd) y el número total de receptores (B_m).

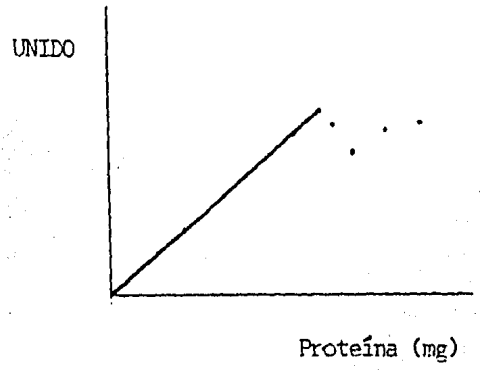




Para poder estudiar las interacciones ligando-receptor es necesario, antes que nada establecer la concentración de ligando que satura a una cantidad determinada de proteína, la cual va a estar en función de la densidad de vías neuronales del neurotransmisor en estudio, en la preparación biológica que se esté utilizando.

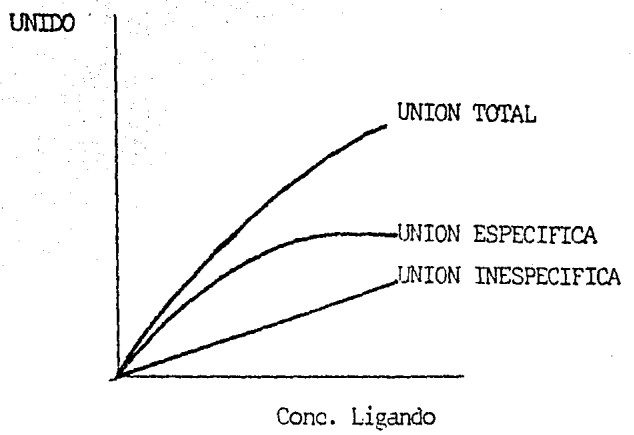
Una vez delimitado esto, ahora lo que podemos hacer es incrementar la cantidad de proteína a fin de tener una mayor cantidad de complejo ligando-receptor y sea más fácil de cuantificar, sin embargo, hay que

estar seguros de que a esa concentración de proteína, efectivamente la unión del ligando será mayor, y que éste no haya sido depletado. Para esto es necesario hacer un experimento en el cual empleemos una concentración fija de ligando radiactivo y se varíe la cantidad de proteína.



Es claro que vamos a trabajar con una cantidad de proteína en la cual la unión del ligando sea directamente proporcional a la cantidad de proteína (fase lineal de la gráfica).

Por otra parte, como no se tiene una preparación pura de los receptores a cuantificar, y como el ligando se va a unir también a otras proteínas de la preparación en una forma inespecífica, es necesario emplear otro ligando, éste no marcado radiactivamente, el cual, en un ensayo paralelo, desplace al ligando marcado de los receptores pero no de las proteínas a las que está unido inespecíficamente. Esto se logra empleando, en este ensayo paralelo, una concentración de ligando frío aproximadamente 100 veces mayor.



UNION ESP = UNION TOTAL - UNION INESP.

2/ MATERIALES Y METODOS.

Sujetos

Veinte ratas hembras de la cepa Winstar-Porton de 90 días de nacidas y de aproximadamente 200 g de peso fueron usadas en este experimento. Los animales fueron colocados en cajas individuales y mantenidos con comida (Nutricubos, Purina) y agua ad libitum por una semana. Durante los siguientes diez días su peso fué reducido al 85% del peso que presentaban después de la primera semana. Los animales fueron divididos al azar en dos lotes de 10 individuos cada uno, uno control pasivo y el otro grupo entrenado. El segundo lote se dividió también en dos grupos, uno control pasivo y otro sobreentrenado, ambos grupos de cinco animales.

Condicionamiento Operante.

En la primera sesión de entrenamiento, todos los animales recibieron 5 píldoras de alimento de 45 mg cada una (Bioserv). Una vez que el animal comió todo el alimento, se inició el primer ensayo del entrenamiento. Cada ensayo empezó con la salida de una palanca iluminada por espacio de 10 segundos, estímulo condicionado (EC), e inmediatamente después se le suministró una píldora de alimento, estímulo no condicionado (ENC), en un comedero; el intervalo entre ensayos (EEE) fué de 70 segundos. Cada sesión consistió de 50 ensayos o presentaciones del par de estímulos (excepto la primera sesión que fué de 10 ensayos). El apareamiento de los estímulos (EC-ENC) fué independiente de la conducta o respuesta a la palanca por el animal, a esto se le llama "automoldeamiento". En él se pretende que el sujeto asocie la presión de la palanca a la obtención del alimento, por lo que ante una respuesta del sujeto

durante el estímulo condicionado, la palanca fué retirada y se le proporcionó el alimento al animal y a partir de esto se tomó el intervalo de 70 segundos para el siguiente ensayo. Las respuestas correctas de presionar la palanca fueron transformadas como un porcentaje del total de ensayos de cada sesión. Con los valores de cada sesión se obtienen curvas del grado y velocidad del aprendizaje.

Los animales entrenados fueron sometidos a 3 sesiones de entrenamiento, una cada día, mientras que los animales sobreentrenados a 10 sesiones, a razón de una por día. Los animales control pasivo, recibieron la misma cantidad de píldoras de alimento que los animales experimentales sin entrar a la caja de condicionamiento.

Sacrificio y Disección.

Al finalizar la última sesión de entrenamiento las ratas fueron sacadas de las cajas experimentales y 60 minutos después fueron sacrificadas por decapitación.

Las cabezas fueron congeladas por la inmersión de las mismas en nitrógeno líquido durante 5 segundos y los cerebros fueron disecados en una caja de petri sobre hielo en el cuarto frío (4°C).

Los cerebros fueron seccionados con un corte coronal a la mitad del quiasma óptico. De la parte anterior de este corte la cabeza del núcleo caudado fué disecada después de remover el septum. De la parte posterior del cerebro, tanto el cerebro medio como el diencéfalo fueron eliminados, esto permitió una mayor facilidad en la disección del hipocampo. De la corteza restante, y después de obtener la amígdala, se separó una porción de corteza tempo-parietal.

Preparación de la Fracción Sinaptosomal Cruda.

Cada área cerebral de cada grupo fué conjuntamente homogeneizado en 12 volúmenes de sacarosa 0.32 mol/l y posteriormente centrifugada a 340 x g por 10 minutos. La pastilla (fracción nuclear) fué descartada y el sobrenadante vuelto a centrifugar en la misma forma. Nuevamente se desechó la pastilla y el sobrenadante fué centrifugado 20,000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante (fracción citoplasmática) fué desechado y la pastilla (fracción sinaptosomal cruda) fué suspendida en 10 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 50mmol/l pH = 7.4 y se separó una alícuota de 100µl de cada área y cada grupo a fin de determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry (1951). Las preparaciones fueron guardadas a -70°C hasta que se utilizaran para las determinaciones de unión.

Técnica de la Unión del Ligando Específico al Receptor Muscarínico.

Ligando Marcado.- (^{3}H)-N-Metilescopolamina (antagonista) (74 Ci/mmol, Amersham).

Ligando Frío.- Bromuro de N-Metilatropina (antagonista desplazador.

La estandarización de la técnica de unión fué previamente desarrollada en este laboratorio por Beatriz Osorio. La unión de (^{3}H)-N-Metilescopolamina fué determinada por la incubación de aproximadamente 400µl de la preparación sinaptosomal (0.75 mg proteína) con 10-80µl de la apropiada concentración de (^{3}H)-N-Metilescopolamina (0.25, 0.35, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3 nmol/l) en un volumen final de 1 ml ajustado con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4 (NaCl 166, KCl 4.7, $MgSO_4$ 2.5,

$CaCl_2$ 1.25 y NaH_2PO_4 2.5 mmol/l) a 30°C por 60 minutos en un baño con agitación. Al finalizar el período de incubación, 800µl de la mezcla de reacción fueron filtrados bajo presión de 200 mmHg a través de discos de papel Whatman GF/B de 26 mm de diámetro, los cuales fueron lavados dos veces con 10 ml de solución amortiguadora de Krebs-Ringer fría (4°C). Los filtros fueron secados con aire caliente durante 30 minutos y contados en 8 ml de líquido de centelleo (tolueno, PPO 3g/1, POPOP 0.3g/1) en un contador líquido de centelleo Beckman LS 7800 con una eficiencia del 59% y una desviación estándard en el conteo. La unión específica de (^{3}H)-N-Metilescopolamina fue definida, en experimentos paralelos, como aquella que es desplazada por la adición de 10µl de Bromuro de N-Metilatropina 0.3 mmol/l. Dicha unión específica representa aproximadamente el 70% de la unión total a una concentración de 2 nmol/l de (^{3}H)-N-Metilescopolamina. Los parámetros de unión fueron determinados por un análisis de Scatchard (1949).

3/ RESULTADOS CONDUCTUALES.

Durante cada sesión de entrenamiento se llevó un registro de las veces en que el animal presionó la palanca durante la aparición e iluminación de ésta. Con este dato, previamente transformado en porcentaje de respuestas durante el estímulo condicionado, se elaboraron curvas de aprendizaje para cada individuo.

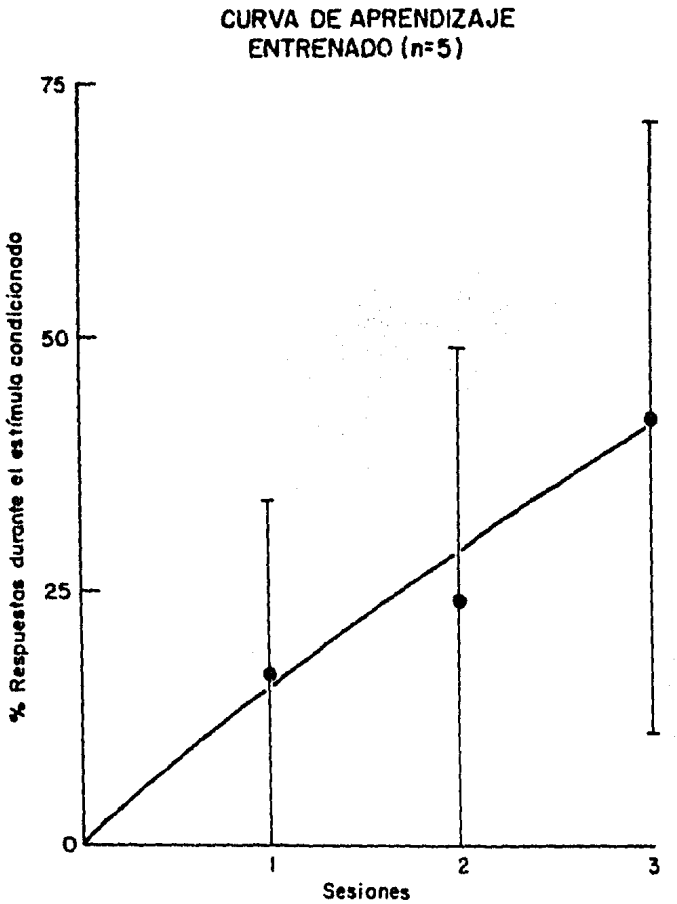


Fig. 1

Por otra parte, se computó un promedio del porcentaje de respuestas durante el estímulo condicionado para cada grupo experimental, en cada

sesión de condicionamiento y con ello, se elaboró una gráfica de porcentaje de respuesta durante el estímulo condicionado contra el número de sesiones, lo cual no es otra cosa que la curva de aprendizaje para cada grupo experimental.

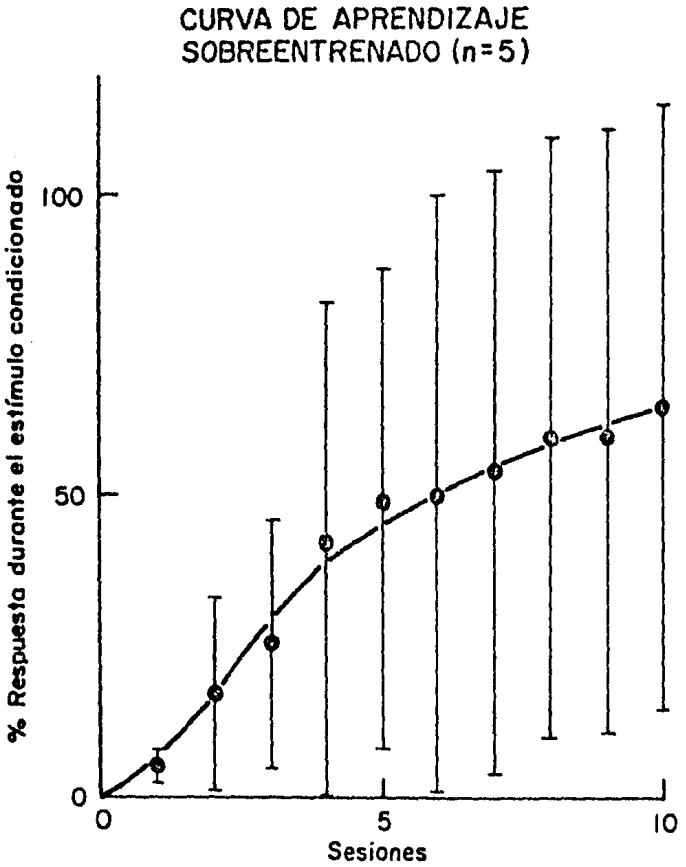


Fig. 2

Tanto en el grupo entrenado (Fig. 1) como en el grupo sobreentrenado (Fig. 2), se observó un aumento en el porcentaje de respuestas durante el estímulo condicionado en función del número de sesiones. Es importante observar el alto grado de variabilidad de individuo a individuo, lo cual se deduce de la alta desviación estándard en cada punto de ambas gráficas.

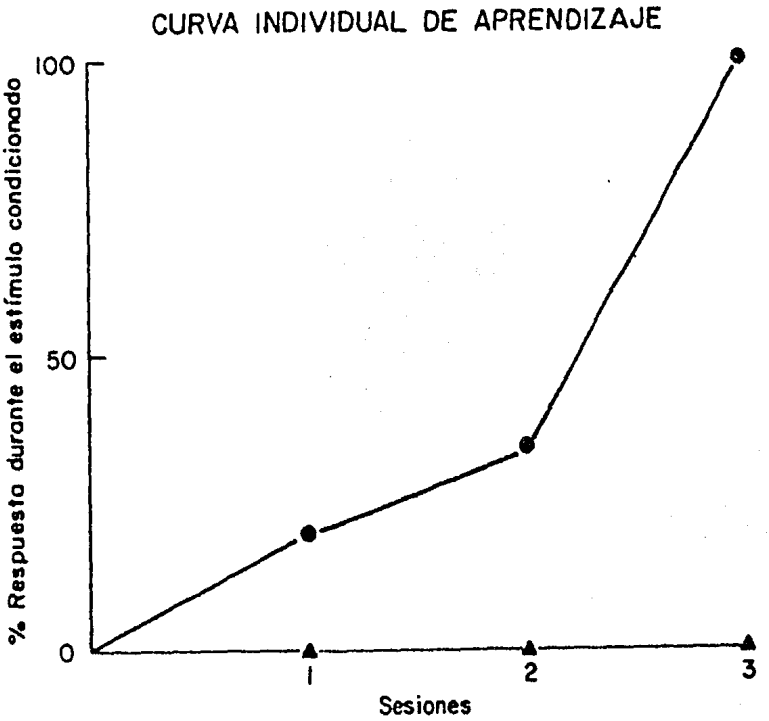


Fig. 3

Debido a ello, se incluyeron dos gráficas más en las que se muestran las respuestas de 2 sujetos, a la sazón los más representativos de la mencionada variabilidad individual, tanto del grupo entrenado (Fig. 3) como del grupo sobreentrenado (Fig. 4).

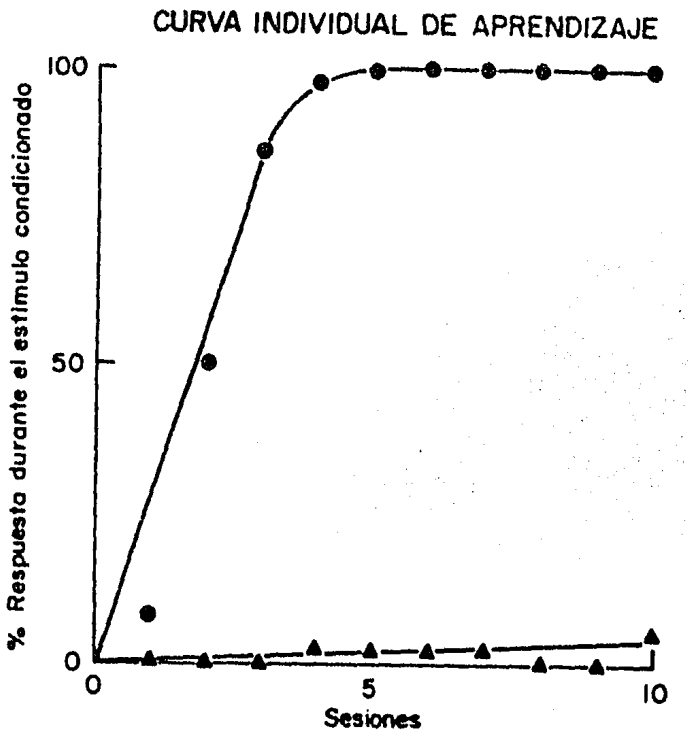


Fig. 4

RESULTADOS BIOQUIMICOS.

La densidad de receptores muscarínicos en el hipocampo de ratas control fué de 0.56 pmol/mg prot, pero este valor decreció de una manera significativa a 0.40 pmol/mg prot en las ratas entrenadas (Fig. 5).

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN HIPOCAMPO DE UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y ENTRADO EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

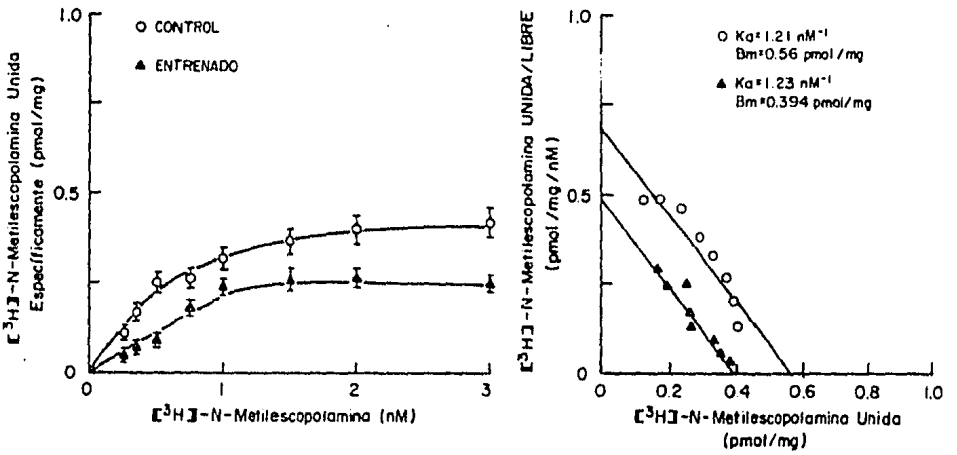


Fig. 5

No se encontró tal diferencia en el grupo sobreentrenado (Fig. 6).

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN HIPOCAMPO DE UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y SOBREENTRENADO EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

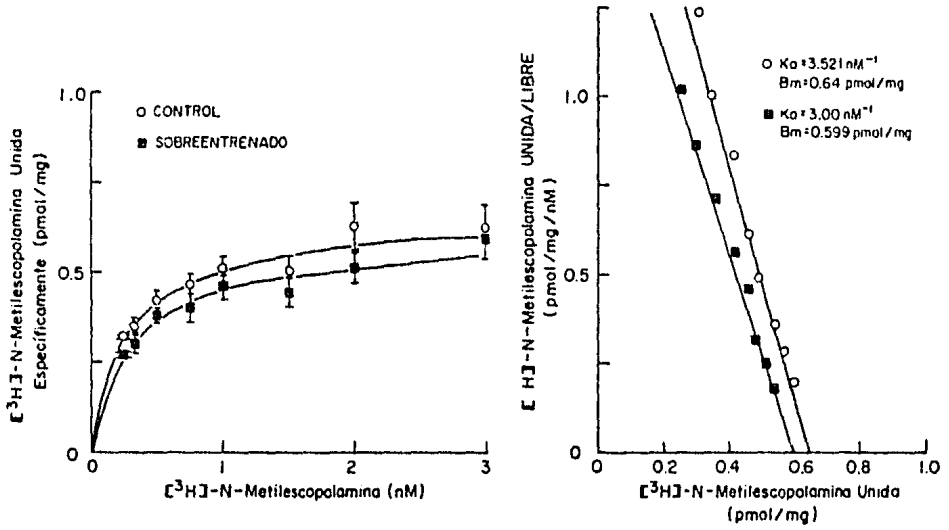


Fig. 6

En cambio, en la amígdala encontramos un incremento significativo en el número de receptores de animales entrenados de 0.81 pmol/mg prot comparado con 0.39 pmol/mg prot del grupo control (Fig. 7).

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN AMIGDALA DE UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y ENTRENADAS EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

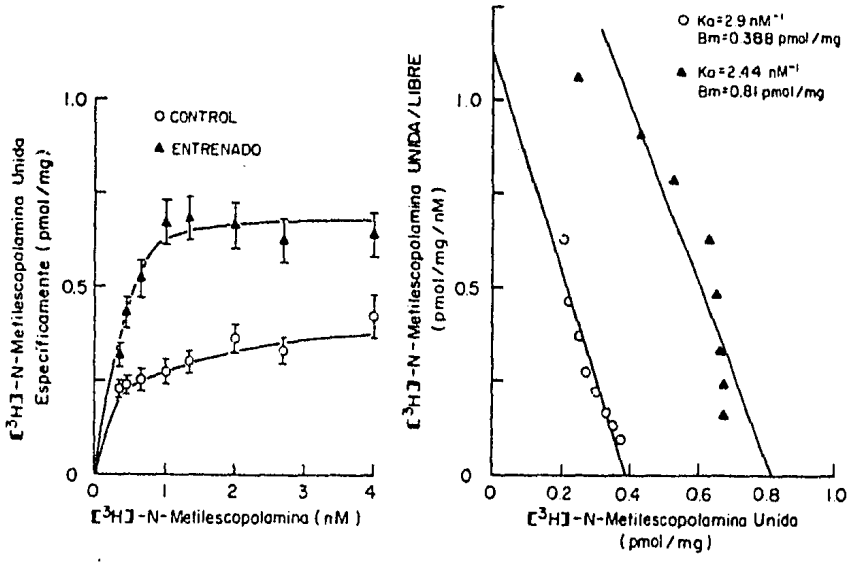


Fig. 7

Una tendencia similar fué encontrada en las ratas sobreentrenadas (0.64 y 0.60 pmol/mg prot respectivamente), sin embargo, este cambio no fué significativo (Fig. 8).

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN AMIGDALA DE UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y SOBREENTRENADO EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

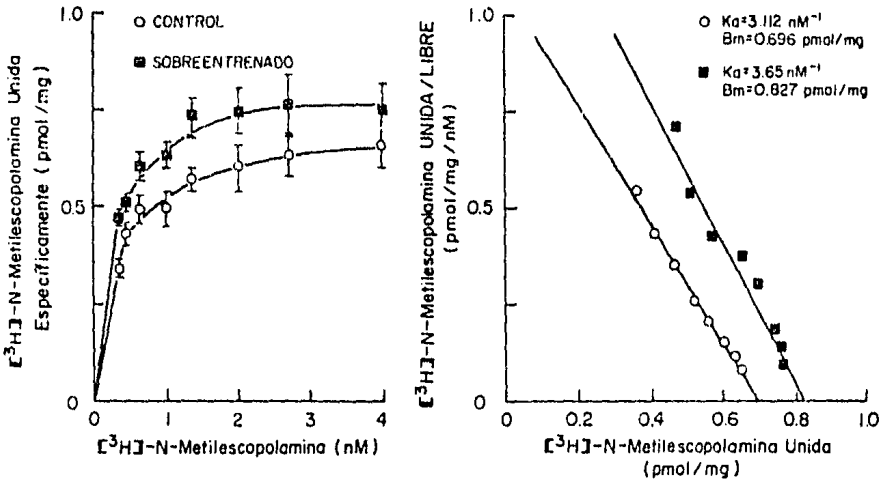


Fig. 8

En septum, la cantidad de receptores de los animales entrenados disminuyó a 0.90 de 1.0 pmol/mg prot del grupo control (Fig. 9).

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN SEPTUM DE UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y ENTRENADO EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

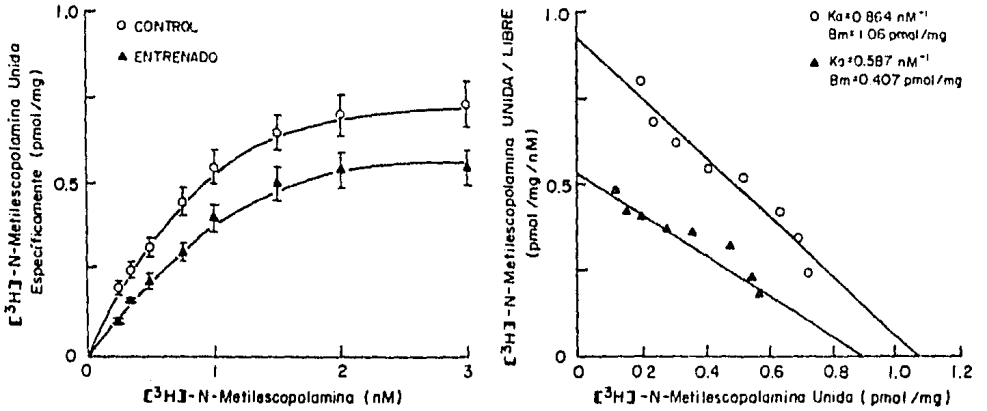


Fig. 9

Este cambio fué mayor en las ratas sobreentrenadas, esto es, bajó a 0.34 pmol/mg prot de 0.86 pmol/mg prot del grupo control (Fig. 10).

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN SEPTUM DE UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y SOBREENTRENADO DE UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

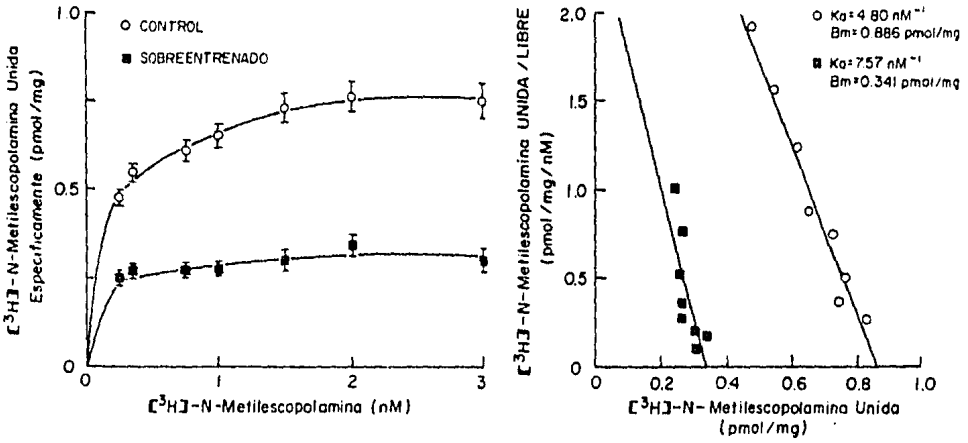


Fig. 10

En la corteza tempo-parietal, la densidad de receptores se incrementó significativamente de 0.48 pmol/mg prot en las ratas control a 0.70 pmol/mg prot en los animales entrenados (Fig. 11).

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN CORTEZA TEMPO-PARIETAL DE UN GRUPO DE - RATAS CONTROL PASIVO Y ENTRENADAS EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL

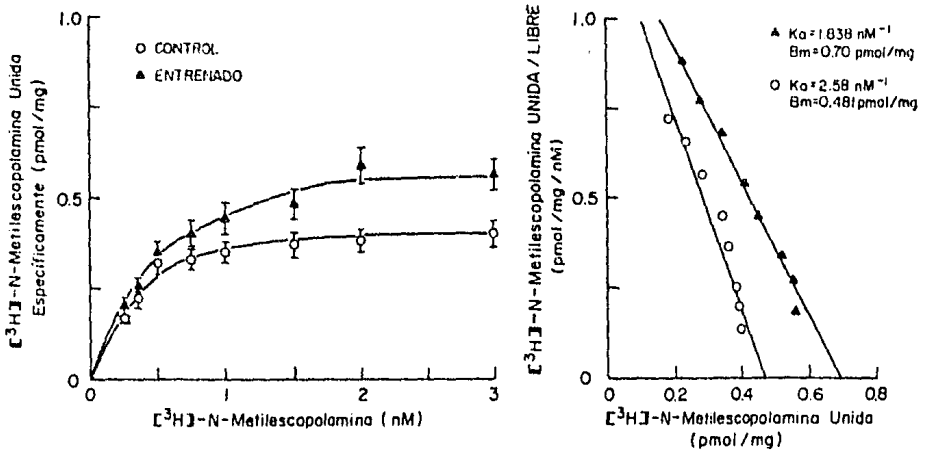


Fig. 11

En los animales sobreentrenados se observó un cambio parecido pero en menor magnitud esto es 0.50 y 0.59 pmol/mg prot respectivamente (Fig. 12).

CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN CORTEZA TEMPOPARIETAL TANTO EN UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y SOBREENTRENADO EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

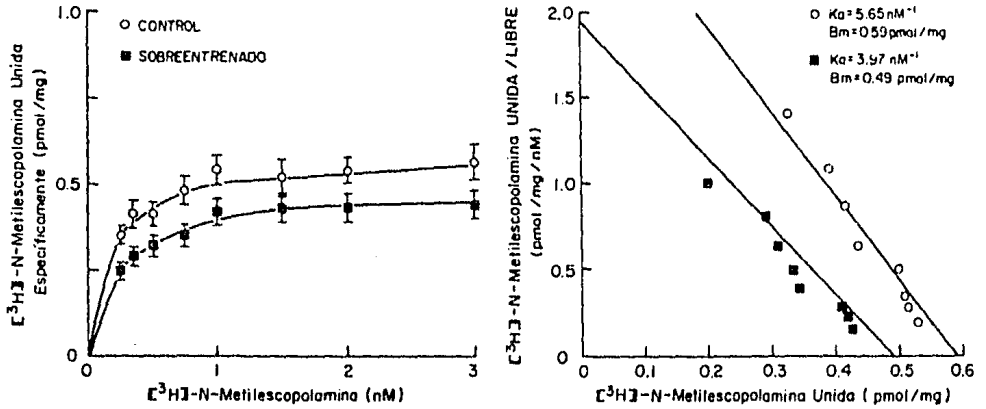


Fig. 12

Finalmente, en el núcleo caudado encontramos una disminución en la cantidad de receptores de 0.62 pmol/mg prot en el grupo control a 0.53 pmol/mg prot en las ratas entrenadas (Fig. 13).

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN CAUDADO DE UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y ENTRENADAS EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

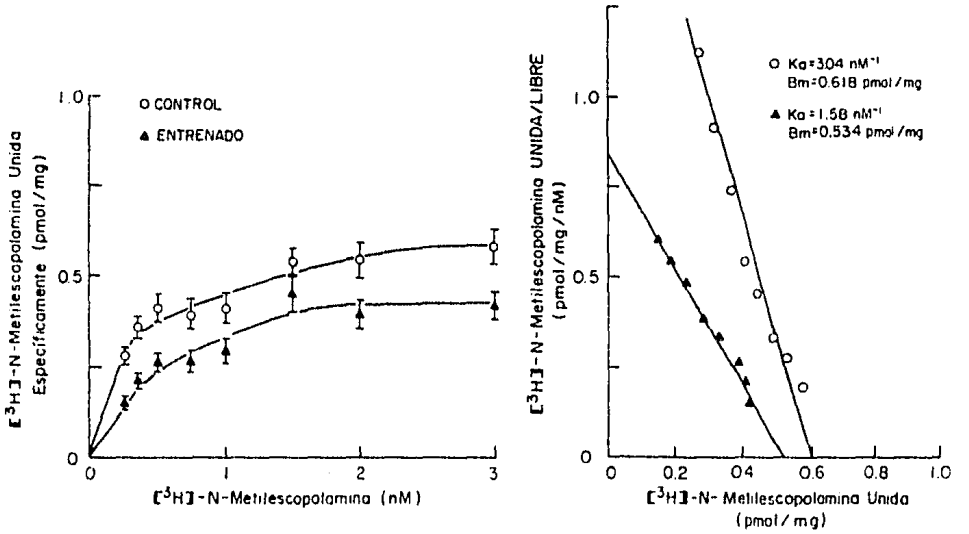


Fig. 13

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN CAUDADO DE UN GRUPO DE RATAS CONTROL PASIVO Y SOBREENTRENADO EN UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

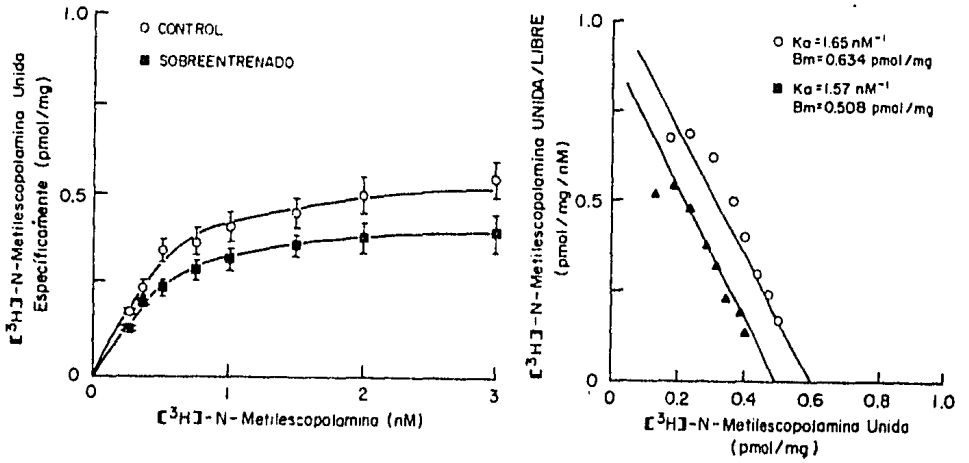


Fig. 14

Se encontró un cambio similar y significativo en el grupo sobreentrenado, el cual disminuyó de 0.63 a 0.50 pmol/mg prot con respecto al control (Fig. 14).

No se observaron cambios significativos en la constante de afinidad, presentándose únicamente pequeños cambios en el caudado y septum de los animales entrenados y en la corteza tempo-parietal de los animales sobreentrenados. Los resultados se encuentran resumidos en la siguiente Tabla y son el resultado de 4 determinaciones diferentes.

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE RECEPTORES MUSCARINICOS Y DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DE N-METILESCOPOLAMINA EN DIVERSAS AREAS DE CEREBRO DE RATA EN GRUPOS CONTROL PASIVO EN ENTRENAMIENTO Y EN SOBREENTRENAMIENTO DE UN APRENDIZAJE INSTRUMENTAL.

AREA / GRUPO	CONTROL	ENTRENADO	CONTROL	SOBREENTRENADO
CAUDADO				
Bm (pmol/mg)	0.618	0.534	0.634	0.508
Ka (nM^{-1})	3.040	1.580	1.650	1.570
HIPOCAMPO				
Bm	0.560	0.394	0.640	0.599
Ka	1.210	1.230	3.521	3.000
SEPTUM				
Bm	1.060	0.907	0.866	0.341
Ka	0.864	0.587	4.800	7.570
AMIGDALA				
Bm	0.388	0.810	0.696	0.827
Ka	2.900	2.440	3.112	3.650
CORTEZA T. P.				
Bm	0.481	0.700	0.498	0.593
Ka	2.580	1.838	3.970	5.529

4/ DISCUSION.

Hay evidencias claras que la neurotransmisión colinérgica participa en el proceso del aprendizaje, de hecho el empleo de bloqueadores colinérgicos impide el aprendizaje de diversos paradigmas tanto pavlovianos como instrumentales (Spencer 1983).

La densidad y distribución de los receptores muscarínicos en el cerebro de rata ha sido ampliamente estudiada (Kobashy 1978), y en base a ello podemos afirmar que los receptores colinérgicos más abundantes en el cerebro de rata son los muscarínicos, y que su densidad es de mayor a menor en las siguientes áreas cerebrales: núcleo caudado, hipocampo, septum, amígdala, corteza tempo-parietal, etc.

Ahora bien, como ya se apuntó, uno de los posibles factores limitantes de la transmisión sináptica es la disponibilidad de suficientes receptores post-sinápticos al neurotransmisor, en este caso, acetilcolina.

Es obvio, que si los receptores son un factor limitante de la neurotransmisión deben de presentar un sistema de regulación, ya que ellos a su vez serían reguladores de la transmisión sináptica.

En apoyo a lo anterior, en el presente trabajo, mostramos cambios principalmente en el número de receptores muscarínicos, como una respuesta a cambios en la demanda funcional de ciertas sinapsis en condiciones fisiológicas, tal como puede existir durante un aprendizaje.

Otro tipo de cambios o de regulación funcional de los receptores

ocurre casi siempre en condiciones no fisiológicas, tal como lo es la administración crónica de ciertas drogas o por lesiones cerebrales, tal es el caso de los fenómenos conocidos como supersensibilización y desensibilización de receptores.

Sabemos que el grado de funcionalidad de la transmisión sináptica puede modificarse farmacológicamente y que esta modificación puede residir precisamente en una variación en la función de los receptores. De acuerdo a ello, existen dos extremos en la eficiencia de la neurotransmisión, la supersensibilidad y la desensibilización (Chuang 1984).

La supersensibilidad es causada por una ausencia, casi completa y prolongada, de la estimulación del receptor y generalmente está asociada a un aumento en el número de receptores; luego el empleo de un inhibidor de la síntesis de un neurotransmisor produciría tal fenómeno.

Contrariamente, la desensibilización se debe a una excesiva estimulación del receptor, y esto podría producirse por ejemplo, al emplear inhibidores de las enzimas degradadoras del neurotransmisor.

El tipo de regulación que los receptores llevan a cabo en el aprendizaje, como en el presente caso, no es del tipo ni de la magnitud de los de supersensibilidad ni de desensibilización, ya que éstos se presentan como consecuencia de una manipulación farmacológica (Siman 1981).

El presente caso debe ser un sistema de regulación más directo y más inmediato, esto es, suponemos que en condiciones de demanda, el número

de receptores se incrementará y esto puede ser debido fundamentalmente a dos factores:

a) Exposición o desencubrimiento de receptores ocultos en la membrana lipídica (receptores crípticos).

b) Síntesis de novo de receptores.

De hecho, parecen existir ambos, uno precede al otro, es decir, la exposición o desencubrimiento que ocurre en el ambito de minutos, precede a la síntesis de novo de los receptores.

Siempre que se aumenta la demanda de una determinada proteína y ésta es sintetizada en mayor cantidad, se acelera también su recambio. Por recambio entendemos (el número de veces que una molécula de una especie x se sintetiza y degrada en la unidad de tiempo). Un incremento en el recambio de una proteína se traduce en una disminución en la vida media de la molécula. Los receptores, al ser proteínas, siguen este comportamiento. Luego, al existir una mayor demanda de receptores, debida a la activación de una vía nerviosa, éstos primero ven incrementando su número, debido a la exposición de los receptores crípticos, posteriormente se presenta una síntesis de novo, sin embargo, al verse incrementada la síntesis, como ya dijimos, también puede incrementarse la degradación, por lo que el número de receptores podría ser menor (Rose 1980).

En este contexto, puede esperarse un decremento en el número de receptores muscarínicos en los animales entrenados y sobreentrenados y que esta disminución fuese mayor, en aquellas áreas cerebrales con una

5/ CONCLUSIONES.

- Se pudieron detectar y cuantificar cambios en receptores muscarínicos de 3 grupos de ratas sometidas a 0, 3 y 10 sesiones respectivamente (una sesión diaria) de un aprendizaje instrumental.
- Los cambios observados fueron principalmente en el número de receptores muscarínicos.
- En relación a la predicción que hicimos al inicio y que fue el fundamento de este trabajo, así como en base a los cambios de los receptores que aquí encontramos, creemos que sí es posible que la interacción ligando-receptor sea en ciertas condiciones o grado de función sináptica, el paso limitante en la neurotransmisión.
- Creemos que este tipo de cambio no es exclusivo de los receptores muscarínicos.
- Aún cuando en las áreas examinadas encontramos cambios en los receptores muscarínicos, pensamos que este efecto no debe ser generalizado, ya que dichas áreas fueron seleccionadas y se conoce que estan involucradas en el aprendizaje.
- Al final de la 3a. y 10a. sesión de entrenamiento los animales ya habían aprendido a usar o a esperar que hubiera alimento en el comedero.
- Lo anterior sugiere que las ratas ya no estan más en la etapa de adquisición del aprendizaje donde esperaríamos un incremento en el número de receptores. En condiciones idénticas a este experimento, en este laboratorio se encontró que la incorporación de metionina (^{35}S) a proteínas de las mismas áreas disminuyó. Esto es semejante a lo encontrado en el número de receptores, lo que sería de esperar, ya que son moléculas protéicas.

- No sabemos como y en que momento se establecen los cambios del número de receptores. Tampoco tenemos evidencias directas, de que si de alguna manera se pudiera bloquear el mencionado cambio, que pasaría con el aprendizaje.
- Este tipo de cambios, sin excluir otros posibles en otro tipo de moléculas, son probablemente la base no sólo de una mayor eficiencia temporal de una sinapsis o circuito neuronal específico, sino que también pueden modificar otros parámetros de la transmisión sináptica, tales como: la exactitud y presición de su respuesta. Lo anterior constituye la base de ciertas funciones cerebrales, tales como: aprendizaje, memoria, conducta, sus alteraciones, etc.

6/ BIBLIOGRAFIA.

1. Alemán, V; Camacho, J.L.; Bermúdez-Rattoni, F and Prado-Alcalá, R: "Differential ^{35}S-methionine incorporated into protein of different brain areas of the rat during a learning task". Behav. and Neural Biol. 36: 137-195 (1982).

2. Axerold, J: "Neurotransmitters". Sci. Am. 230: 59-71 (1974).

3. Bartus, R.T. and Johnson, H.R.: Short-term memory in the rhesus monkey: "Disruption from the anticholinergic scopolamine". Pharmacol. Biochem. Behav. S: 39-46, 1976.

4. Chuang D.M.; Barbaccia M.L.; Brunello N. and Kinnier W.J.; "Receptor regulation: An overview" in Hanin, J. ed: Dynamics of Neurotransmitter Function". Raven Press New York (1984) pp 281-292.

5. Chung, S.H.: "Synaptic Memory in the hippocampus". Nature 266, 677-678, 1977.

6. Deutsch, J.A., ed: "The physiological basis of memory". The Academic Press (1973) pp 59-76.

7. Downs, D; Caradzo, C.; Schneiderman, N; Yehle, A.L.; Van Dercan, D.H. and Zwilling, G.: "Central effects of atropine upon aversive classical conditioning in rabbits", Physchopharmacology 23: 319-333 (1972).

8. Dunn, A.J.: "Neurochemistry of learning and memory: An evaluation of recent data". Ann Rev. Phsycol. 31: 343-390 (1980).

9. Katz, J.S. and Halstead, W.D.: "Protein organization and mental function". Phychology Monographs 20: 1-38 (1950).

10. Kobashy, R.M.; Pavkovitsm; Hvuska, E.R.; Rothschild, R. and Yamamura, H.I.; "Regional distribution of muscarinic receptors in rat brain". Brain Research 154: 13-23 (1978).

11. Lowry, O.H.; Rosenbrough, J.N.; Lwers Fan, H.; Randall J.R.: "Protein measurement with the folin phenol reagent". Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275 (1951).

12. McGaugh, J.L. and Petrinovitch, L.: "Effects of drugs in learning and memory". Int. Rev. Neurobiol. 8: 139-196 (1965).

13. Milar, K.S.: "Cholinergic drug effects on visual descrimination: A signal detection analysis". Psychopharmacology 74: 383-388 (1981).

14. Monné, L.: "Functioning of the cytoplasm" In Nord, F. F. ed: "Advances in enzymology" vol. 8 New York: Wiley (Interscience) (1948).

15. Rose S.P.R.; Gibbs, M.E. and Hambley, J. "Transient increase in forebrain muscarinic receptors following passive avoidance learning in the young chick. Neuroscience. 5: 169-172 (1980).

16. Simar, R.G. and Kleen, W.L. "Specificity of muscarinic acetylcholine receptor regulation by receptor activity" J. Neurochem. 37: 1099-1108 (1981).

17. Spencer, Jr. D.G. and Lui, H.: "Effects of anticholinergic drugs in learning and memory". Drug Development Research 3: 489-502 (1983).

18. Tanzi, E.: Rivista Sperimentalle di Freniatria: 19: 149 (1893).

19. Scatchard, G: "The attractions of proteins for small molecules and ions". Ann NY Acad. Sci. USA. 51: 660-672 (1949).