

Tesis de Posgrado

Participación de la PKC y de su sustrato presináptico GAP-43/B-50 en la plasticidad motora asociada al desarrollo postnatal del estriado de rata.

Paratcha, Gustavo Christian

1997

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

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

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

Cita tipo APA:

Paratcha, Gustavo Christian. (1997). Participación de la PKC y de su sustrato presináptico GAP-43/B-50 en la plasticidad motora asociada al desarrollo postnatal del estriado de rata.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2929_Paratcha.pdf

Cita tipo Chicago:

Paratcha, Gustavo Christian. "Participación de la PKC y de su sustrato presináptico GAP-43/B-50 en la plasticidad motora asociada al desarrollo postnatal del estriado de rata.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2929_Paratcha.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



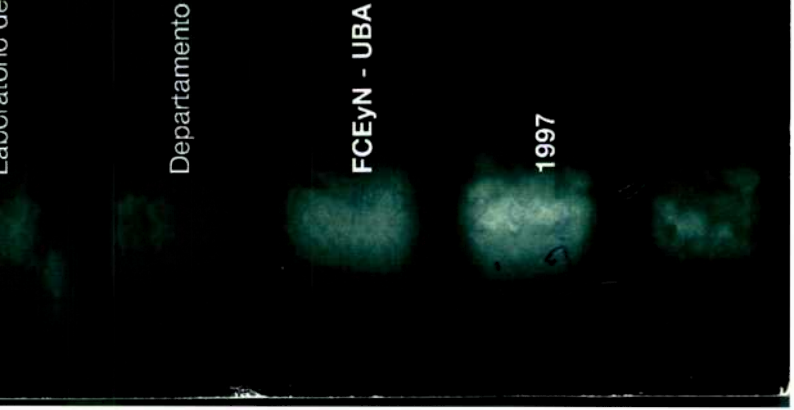
UBA

Universidad de Buenos Aires

Departamento

FCEYN - UBA

1997



INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
1. Plasticidad neuronal y su relación con el desarrollo cerebral	5
2. Comportamiento motor y plasticidad motora	8
2.1. Importancia del estudio del comportamiento motor	8
2.2. Mecanismos plásticos que subyacen a la actividad motora	10
2.3. Comportamiento circular, su relación con el neocórtex	11
2.4. El comportamiento rotatorio como vía de inducción de cambios plásticos	13
2.5. Pruebas para el estudio del comportamiento motor	13
2.5.1. Test de entrenamiento circular (TEC)	15
2.5.2. Test de plataforma giratoria (TPG)	15
3. El cuerpo estriado en el estudio de la plasticidad	16
3.1. Elección del cuerpo estriado para el estudio de plasticidad	16
3.2. El cuerpo estriado y su relación con la actividad motora	17
3.3. El cuerpo estriado y su relación con los procesos cognitivos o asociativos	17
3.4. El cuerpo estriado y los mecanismos comportamentales de recompensa y motivación	18
3.5. El cuerpo estriado y su importancia clínica	19
4. El cuerpo estriado. Estructura y Función	19
4.1 Organización anatómico-funcional del cuerpo estriado	20

4.2. Organización neuronal del estriado	22
4.3. Conexiones neuronales del estriado	23
4.4. Ontogenia del estriado	24
4.5. Neuroquímica del estriado	25
5. El sistema de fosforilación GAP-43/PKC en plasticidad sináptica y neuronal	27
5.1. Sistema de fosforilación de	27
5.2. Clasificación de Proteínas Kinasas	28
5.3. PKC: isoenzimas, localización y función	31
5.4. La fosfoproteína GAP-43/B-50	35
5.5. Participación de la proteína GAP-43/ B-50 y de la PKC en los mecanismos plásticos del sistema nervioso	37
CONSIDERACIONES FINALES Y OBJETIVO DE LA TESIS	39
MATERIALES Y METODOS	41
1. Materiales	41
1.1. Drogas y reactivos	41
1.2. Instrumental	41
1.3. Animales	42
1.3.1. Cepas utilizadas	42
1.3.2. Mantenimiento de los animales	42
2. Entrenamientos	42
2.1. Test de entrenamiento circular (TEC)	42
2.1.1. Diseño y características del equipo	42
2.1.2. Procedimiento del entrenamiento	46
2.1.3. Cuantificación del comportamiento en el TEC	47
2.1.4. Animales controles	47
2.2. Test de Plataforma Giratoria (TPG)	47

2.2.1. Diseño del equipo	47
2.2.2. Procedimiento de entrenamiento	48
3. Obtención del tejido para estudios neuroquímicos	48
3.1. Disección del Cuerpo Estriado	48
3.2. Fraccionamiento subcelular: Preparación de membranas plasmáticas de sinaptosomas (MPS)	49
4. Purificación parcial de PKC a partir de cerebro bovino	50
4.1. Protocolo de purificación de PKC	50
4.2. Medición de la actividad de PKC bovina purificada	51
5. Electroforesis de proteínas	52
6. Análisis de la expresión del mRNA de c-fos	53
6.1 Tratamiento con metrazol	53
6.2. Extracción de RNA	53
6.3. Análisis del RNA por Northern blot	54
7. Determinaciones neuroquímicas	55
7.1 Determinación de acetilcolinesterasa	55
7.2. Evaluación del receptor colinérgico muscarínico	56
7.3. Ensayo de fosforilación de GAP-43	57
7.4. Determinación de la actividad de PKC	58
7.5. Western blot de GAP-43	59
8.0. Análisis estadístico	59
RESULTADOS	61
1. Evaluación del comportamiento de los animales en el TEC	61
1.1. Comparación de la respuesta al TEC entre animales de	

distinta edad	61
2. Identificación de la fosfoproteína GAP-43/B-50 y detección de su fosforilación por PKC en preparaciones de membranas plasmáticas (MPS) de estriado de rata	64
3. Estudio de la fosforilación endógena de GAP-43 en cuerpo estriado de rata de 30 días de edad luego de distintas sesiones de entrenamiento circular (TEC)	68
4. El entrenamiento circular modifica el estado de fosforilación de la proteína GAP-43/B-50 en el cuerpo estriado de rata durante el desarrollo post natal	70
5. El entrenamiento circular no modifica el estado de fosforilación de la proteína GAP-43/B-50 en corteza motora de rata de 30 días de edad	78
6. Participación de la PKC en los cambios asociados con el desarrollo postnatal del estriado de rata luego del entrenamiento circular	81
7. Reducción en la fosforilación endógena de GAP-43 y su correlación con la velocidad desarrollada por los animales durante el TEC	82
8. El entrenamiento circular produce la inducción del proto-oncogen c-fos en estriado de ratas de 30 días	84
9. Reducción en la fosforilación endógena de GAP-43 luego de la actividad motora circular desarrollada en el TPG	86
10. Cinética de la fosforilación endógena de la proteína GAP-43/B-50 en estriado de ratas de 30 días luego de estimulación motora circular utilizado el TPG	91
DISCUSION	96
Selección del modelo y de los marcadores neuroquímicos	96
1. PARTE I	97
1.1. la actividad funcional desarrollada en el TEC	

produce cambios en el estado de fosforilación de la proteína GAP 43. Correlación con un periodo crítico del desarrollo potnatal del estriado de rata	97
1.2. La respuesta neuroquímica al TEC es mayoritaria luego de la segunda sesión de entrenamiento (E2D)	99
1.3. la respuesta se correlaciona con la velocidad desarrollada durante el TEC	100
1.4 Los cambios se correlacionan con un período crítico asociado al desarrollo del estriado de rata	101
1.5. Posibles eventos relacionados con la disminución del estado de fosforilación de la GAP-43 en el sitio específico de la PKC.	103
1.6. La inducción del c-fos: Posible relación con los cambios plásticos	107
2.PARTE II	108
2.1. Los cambios se deben a la actividad motora y no al aprendizaje asociativo	108
2.2. Inversión de los cambios neuroquímicos asimétricos. Evidencias de una regulación interhemisférica de tipo plástica	110
CONCLUSIONES	115
REFERENCIAS	116
AGRADECIMIENTOS	137

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChR	Receptor de Acetilcolina
AMPHs	Anfetaminas
ANOVA	Análisis de Varianza
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
CAM	Calmodulina
CaMK II	Kinasa tipo II dependiente de Ca ⁺⁺ /Calmodulina
ChAT	Colina acetiltransferasa
CCK	Colicistoquinina
CK II	Caseína Kinasa II
DA	Dopamina
D1/D2	Subtipo de receptores dopaminérgicos
DAG	Diacilglicerol o Dioleína
DOPAC	3,4-di-hidrofenilacético
EA	Errores Asociativos
E2D	Entrenamiento de 2 días
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FSC	Flujo Sanguíneo Cerebral
GABA	Acido γ -aminobutírico
GAP-43	Proteína Asociada al Crecimiento Nervioso
GAPDH	Gliceraldeído fosfato deshidrogenasa
H7	1-(5-isoquinolinyl sulfonyl)-2-methylpiperazine

IP₃	Inositol Trifosfato
<i>ip</i>	Intraperitoneal
L	Número de refuerzos necesarios para alcanzar ½ de la Vm
LPO	Lóbulo Paraolfatorio
LTD	Depresión Sináptica de Largo Plazo
LTP	Potenciación a Largo Plazo
MP	Membrana Plasmática
MPS	Membrana Plasmática de Sinaptosoma
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
NMDA	N-metil D-aspartato
6-OHDA	6-hidroxidopamina
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PKC	Proteína Kinasa C
PET	Tomografía de Emisión Positrónica
PMSF	Phenyl Methyl Sulphonyl Fluoride
PS	Fosfatidilserina
RC3	Neurogranina
SAC	Membranas de Staphilococcus Aureus
± SD	Desvío Standard
SDS	Dodecyl Sulfato de Sodio
SL-O	Streptolysina-O
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
TBS	Tris Buffer Salino
TEC	Test de Entrenamiento Circular

TPA	4 β -phorbol 12-mirystate-13-acetate
TPG	Test de Plataforma Giratoria
Vm	Velocidad máxima teórica

RESUMEN

El comportamiento motor condicionado realizado mediante el uso del test de entrenamiento circular (TEC) produce una reducción significativa en la fosforilación endógena de la proteína GAP-43/B-50 en el estriado contralateral al sentido de giro. La magnitud de este cambio asimétrico es del 29,3 % respecto al estriado control y del 29,5 % respecto del estriado ipsilateral proveniente de los mismos animales entrenados. Los animales controles no mostraron diferencias asimétricas entre estriado izquierdo vs. derecho o ipsi vs. contralateral. Estos cambios ocurren 30 minutos después de finalizada la actividad fisiológica en el TEC, y son independientes de la dirección de giro elegida. Estudios paralelos de western blot de GAP-43 y ensayos de fosforilación exógena usando PKC purificada demuestran que esta fosfoproteína participa a través de una disminución en su estado de fosforilación en el residuo Ser-41 (sitio específico de PKC). Estos cambios plásticos solo se producen cuando los animales son entrenados a los 30 días de edad (período crítico). El entrenamiento de animales de 20, 40 y 60 días de edad no produce cambios en estos marcadores neuroquímicos. A los 30 días la caída en la fosforilación in vitro de la GAP-43 se correlaciona con la velocidad desarrollada durante el TEC. Además de estos cambios los animales entrenados también muestran una inducción del mRNA del proto-oncogén c-fos entre los 30 y 60 minutos después de finalizada la actividad. La realización de una segunda prueba motora, el test de plataforma giratoria (TPG) confirma los cambios observados a los 30 días en la fosforilación in vitro de la GAP-43 y en la actividad total de PKC, y demuestran que la caída en la fosforilación de la GAP-43 es proporcional a la velocidad de giro.

Estudios cinéticos demuestran las características plásticas de la fosforilación in vitro de la GAP-43, de la actividad total de PKC y de la capacidad de unión del ligando del receptor muscarínico $^3\text{H-QNB}$. Estudios previos realizados por nuestro laboratorio demostraron que a los 30 días del desarrollo postnatal del estriado cambios permanentes en los niveles de receptores mACh y dopaminérgicos D1 y D2 son producidos como consecuencia de la actividad motora fisiológica. Los cambios inmediatos en estos marcadores generales de plasticidad neuronal podrían representar los pasos iniciales que

conducen al establecimiento de cambios plásticos de largo plazo. Además estos marcadores sugieren la participación de mecanismos plásticos durante el “período crítico” en el cual se generan los cambios permanentes. Estos resultados demuestran la participación de la fosforilación de la GAP-43 en los mecanismos plástico dependientes de la actividad motora durante un período crítico del desarrollo estriatal.

Palabras claves: GAP-43/B-50; PKC; c-fos; estriado de rata; plasticidad motora; test de entrenamiento circular (TEC); Test de plataforma giratoria (TPG)..

Participation of the PKC and of its presynaptic substrate GAP-43/B-50 in the motor plasticity associated with the postnatal development of rat striatum.

ABSTRACT

The conditioned motor behavior in the circling training test produce a significant reduction in the endogenous phosphorylation of GAP-43/B-50 in the contralateral striatum to the sense of turn. The level of this asymmetric change is 29,3 % vs. control striatum and 29,5 % respect to ipsilateral striatum isolated from the same trained animals

The control animals did not show asymmetric differences between left vs. right or ipsi vs. contralateral striatum. These changes occur 30 minutes post-physiological activity in the circling training test and are independent of the turning direction chosen. Immunoblots of GAP-43 and exogenous phosphorylation assays using purified PKC demonstrated that this phosphoprotein changes its phosphorylation state in Ser-41 (specific site for PKC). These changes are produced only when the animals are trained at 30 days of age (critical period). The training of the animals at 20, 40 and 60 days of age did not produce changes in this neurochemical marker. At 30 days of age the drop in the endogenous phosphorylation of GAP-43 is correlated with the speed developed during the circling training. Moreover of these changes, the trained animals also show a mRNA c-fos induction between 30 and 60 minutes after training. Using another motor test (Platform giratory) we confirmed the changes observed previously in the endogenous phosphorylation of GAP-43 and in the PKC activity (30 days of age). Kinetics studies demonstrated the plastic characteristics of the in vitro GAP-43 phosphorylation, PKC activity and capacity of mAChR binding. These results evidence the possible existence of interhemispheric regulatory mechanisms. Previous studies of our laboratory showed that at 30 days of postnatal development permanent changes in the levels of mAChR and dopaminergic D1 and D2 receptors are produced by physiological motor activity. The immediate changes in these general markers of neuronal plasticity could be related with the long term plastic changes in neuroreceptors. Moreover, these markers suggest the participation of plastic mechanisms during the critical period in which permanent changes are triggered. These results demonstrated the participation of GAP-43 phosphorylation in the motor activity-dependent plasticity during a critical period of striatal development.

Key words: GAP-43/B-50; PKC; c-fos; rat striatum; motor plasticity; circling training; giratory platform test.

INTRODUCCION

1.PLASTICIDAD NEURONAL Y SU RELACION CON EL DESARROLLO CEREBRAL

El sistema nervioso central (SNC) presenta una alta capacidad de adaptación frente a los condicionamientos ambientales, a través de los mecanismos de plasticidad que en él se desarrollan. En el sistema nervioso (SN) el patrón de conexiones sinápticas es plástico, esto significa que la experiencia puede moldearlo estimulando o inhibiendo la actividad eléctrica de manera tal que puede ejercer una influencia duradera sobre los patrones posteriores de comportamiento. Estas propiedades posibilitan la adaptación frente a los distintos condicionamientos externos, y son en gran medida la base del éxito evolutivo. Por lo tanto, variaciones en la afinidad (Leidenheimer y col, 1992; Wang y col,1993) y número de receptores (Hydén y col,1984), modificaciones en distintas rutas de transducción de señales (Larkman y Jack 1995; Ronald y col, 1995) y en los mecanismos de neurotransmisión (Ghirardi. y col, 1992), cambios en el número de neuronas o en los procesos de remodelamiento sináptico (Roberts y Difiglia, 1990) son las principales alteraciones neuroquímicas y morfológicas que se establecen en el SN y que le permiten adaptarse, no sólo durante el desarrollo, a los estímulos externos.

Cualquiera que haya observado los esfuerzos de un bebé intentando alcanzar su juguete habrá advertido que la capacidad de un adulto para la percepción y el movimiento no es algo innato, sino que debe desarrollarse con el tiempo, mediante el ejercicio. El programa genético desarrollado durante la gestación, finaliza en un recién nacido con los órganos sensoriales sin estrenar y un cerebro bien formado cuyos 100.000 millones de neuronas se encuentran asociadas en vías que están especializadas en llevar a cabo funciones altamente específicas. Pero antes de que el cerebro en desarrollo alcance su plena capacidad para procesar y analizar la experiencia sensorial, ésta última debe dejar su huella sobre la estructura fina del cerebro.

Las primeras evidencias respecto a la importancia del ambiente en el desarrollo y plasticidad del SNC surgieron a partir de los estudios realizados por Hubel y Wiesel (1962), sobre fisiología de la corteza visual del gato. Los experimentos llevados a cabo por éstos investigadores determinaron que limitando la actividad de un ojo, se afectaba gravemente el desarrollo de las columnas de dominio ocular. Las mediciones de actividad eléctrica registradas en la cuarta capa de la corteza visual, pusieron de manifiesto que casi todas las células responden exclusivamente a las señales procedentes del ojo destapado. Estos efectos a su vez dependían de la edad a la que ocurría la inutilización ocular. Hubel y Wiesel denominaron con el término "*período crítico*", al intervalo de tiempo comprendido entre el segundo y cuarto mes después del nacimiento, período durante el cual la corteza visual del gato goza de plasticidad suficiente para cambiar su organización en respuesta a señales provenientes de la retina. Es decir, algunas de las vías que se establecen durante la gestación, mantienen su plasticidad, sólo durante un período limitado después del nacimiento, durante el cual la red de conexiones se va ajustando. Estos períodos críticos varían entre las diferentes estructuras del cerebro (Wiesel, 1982).

Estudios recientes realizando inducción de potenciación sináptica de largo plazo (LTP) en secciones de corteza visual de ratas de diferentes edades, mantenidas en luz y en oscuridad, demostraron que la susceptibilidad al LTP coincide con el período crítico descrito para la corteza visual (Kirkwood y col, 1995). Estos resultados suponen la hipótesis de que el LTP refleja un mecanismo normal de modificación sináptica dependiente de la experiencia en el cerebro en desarrollo. Esta forma de LTP en corteza visual requiere activación de receptores de N-metil D-aspartato (NMDA). Durante el desarrollo se observó una declinación en la función del receptor de NMDA en la capa cuatro de la corteza visual, la cual es impedida por el mantenimiento en la oscuridad. También se observó que el refinamiento topográfico de las proyecciones que van desde el tálamo a la corteza aumentan a través de procesos dependientes de la actividad. De esta manera los axones talámicos compiten por sus blancos corticales (Goodman y Shatz, 1993). Se ha propuesto que estas conexiones son reforzadas por la actividad pre y postsináptica durante el desarrollo. Un mecanismo probable para estos procesos también podría ser el LTP mediado por la activación de receptores de NMDA. Crair y Malenka (1995), demostraron que el período durante el cual el LTP puede ser inducido se

correlaciona estrechamente con el período crítico (dependiente de la experiencia sensorial) para la reorganización topográfica de las aferencias talámicas. Estos experimentos indican que la actividad neuronal es importante durante el establecimiento o mantenimiento de los circuitos neuronales (Frank, 1987). Sin embargo, en el sistema neuromuscular las sinápsis son eliminadas más lentamente bajo condiciones de actividad disminuída, y más rápidamente por el aumento de actividad (Purves y Lichtman, 1980). Estos experimentos soportan la idea de que la actividad neuronal puede ser un determinante de eliminación de sinápsis.

Durante las primeras etapas del desarrollo del SNC existe un programa genéticamente determinado que incluye la proliferación y migración neuronal, selección del tipo de neurotransmisión, y la formación de patrones generales de conectividad neuronal (Jacobson M (Ed), 1978; Williams y Herrup, 1988; Klose y Bentley, 1989; Cowan y col, 1984). Recién al final de esta etapa se ponen de manifiesto fenómenos relacionados con la competencia por factores tróficos y muerte celular programada. De aquí en más el desarrollo se establece funcionalmente, mediante la interacción del sistema con la experiencia ambiental (determinante de actividad). Por lo tanto la ausencia de una adecuada experiencia sensorial interfiere con el establecimiento y refinamiento de los circuitos neuronales. De esta manera la existencia de una plasticidad dependiente de la actividad durante el desarrollo, otorga la ventaja evolutiva de confrontar y modelar su estructura en función de los estímulos ambientales a los que será expuesto el individuo. Esto le permitirá una mejor adaptación a las necesidades del medio.

2. COMPORTAMIENTO MOTOR Y PLASTICIDAD MOTORA.

2.1. Importancia del estudio del comportamiento motor:

Un importante campo de las investigaciones en neurobiología corresponde al estudio del comportamiento motor. Diferentes metodologías. (bioquímicas, moleculares, electrofisiológicas, psicológicas y de procesamiento de imágenes) han sido utilizadas para comprender la fisiología de los circuitos neuronales que participan durante el control de la actividad motora normal o patológica. Las enfermedades de Huntington y

Parkinson son dos importantes patologías motoras que están relacionadas con la pérdida progresiva del control voluntario del movimiento debido a procesos neurodegenerativos que involucran a los ganglios basales (Penney y Young, 1983).

Independientemente del estudio de estas disfunciones motoras, la comprensión de los circuitos neuroquímicos que subyacen al comportamiento motor también presentan interés clínico. Existen evidencias de que una mayor actividad física se relaciona con un mejor mantenimiento de las funciones cognitivas, incluyendo los procesos de memoria, durante el envejecimiento (Blomquist y Danner, 1987; Clarkson-Smith y Hartley, 1989; Dustman y col, 1990; Emmerson y col, 1989; Gleser y Mendelberg, 1990; Rogers y col, 1990; Fordyce y Farrar, 1991; Lupinacci y col, 1993).

En este sentido, estudios con animales de experimentación han demostrado que la actividad motora puede modificar algunos sistemas de neurotransmisión (MacRae y col, 1987). Además se ha observado que puede impedir la degeneración de la función colinérgica relacionada con el envejecimiento (Fordyce y Farrar, 1991), modificar los niveles del receptor colinérgico muscarínico en hipocampo (Fordyce y col, 1991) y del dopaminérgico en cuerpo estriado (Gilliam y col., 1984). Estudios recientes también demostraron que el ejercicio físico aumenta los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento que mantiene la función y promueve la sobrevivencia de algunas neuronas (Neeper y col., 1996). Además se ha descrito que la actividad motora ayuda a proteger a ciertas neuronas del daño por radicales libres. De esta manera el ejercicio físico podría ayudar a incrementar la resistencia del cerebro contra el daño y la degeneración a través del mantenimiento, promovido por ciertas trofinas, del crecimiento, función y sobrevivencia neuronal.

Más allá de estos resultados, las bases neuroquímicas y celulares del comportamiento motor de tipo plástico requieren aún una intensiva investigación. Debe ser demostrado si la actividad motora plástica puede influir sobre otros sistemas moleculares claves para el mantenimiento y plasticidad del cerebro. Los datos aquí expuestos abren la posibilidad de que el ejercicio físico pueda incrementar la disponibilidad de trofinas, y de esta manera proteger a ciertas poblaciones neuronales contra insultos de diferentes tipos.

2.2. Mecanismos plásticos que subyacen a la actividad motora:

Si bien poco es lo que se sabe acerca de los cambios neuroquímicos plásticos que subyacen a la actividad motora, nuevas conclusiones han surgido a partir del estudio de la actividad motora desarrollada por ratas adultas en ruedas giratorias. Estos estudios demostraron la inducción hipocampal de dos neurotrofinas, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico BDNF (Neeper y col, 1995; Neeper y col, 1996). Ambas trofinas fueron inducidas por el ejercicio físico. Además amplias evidencias indican que la producción de BDNF en el cerebro está regulada por por la actividad neuronal. Estos factores tróficos participan en la plasticidad cerebral (Thoenen, 1995), relacionandose con la funcionalidad a través de la regulación del turnover de neurotransmisor (Alderson y col, 1990; Nonomura y Hatanaka, 1992; sauer H y col, 1993) y con el crecimiento y supervivencia neuronal (Alderson y col, 1990; Nonomura y Hatanaka, 1992; Diamond y col, 1992).

Diferentes estudios han demostrado que la plasticidad neuronal durante un limitado periodo del desarrollo presenta características particulares que lo diferencian de la plasticidad del cerebro maduro. De esta manera, el desarrollo anatómico y fisiológico de los circuitos motores pueden ser dramáticamente alterados por la actividad motora realizada durante un periodo de plasticidad asociado con la vida postnatal temprana. De manera análoga la manipulación del ambiente visual puede interferir con la plasticidad sináptica dependiente de la experiencia durante un periodo de sensibilidad del desarrollo postnatal temprano de la corteza visual.

De aquí en adelante nos referiremos en particular a los procesos plásticos que subyacen a un comportamiento motor circular durante el desarrollo postnatal del estriado de rata.

Investigaciones desarrolladas en nuestro laboratorio han demostrado que los niveles de receptores muscarínicos de acetilcolina y dopaminérgicos de tipo D2 pueden ser afectados en forma permanente (hasta un año después) por la actividad motora, mediante el empleo de un test de comportamiento motor condicionado (test de entrenamiento circular: **TEC**) (Ibarra y col, 1995; Ibarra y col, 1996) o como consecuencia de la locomoción realizada sobre un disco giratorio (Ibarra GR, 1997). Estos cambios plásticos de largo plazo solamente fueron observados cuando las ratas fueron entrenadas

a los 30 días de edad, pero no cuando los animales fueron entrenados a los 20, 40, 60 o 90 días de edad. En particular, la caracterización de la caída permanente de los receptores colinérgicos muscarínicos no mostró asimetrías, pero sí una disminución diferencial según el sexo. La reducción observada en el sistema colinérgico muscarínico correlacionó con la variación observada en el sistema dopaminérgico de tipo D2. De esta manera los niveles muscarínicos y el balance con los receptores dopaminérgicos D2 regulan fuertemente los mecanismos moleculares y celulares, por medio de los cuales el estriado ejerce su función motora plástica. Estos resultados demuestran la presencia de un período limitado de sensibilidad durante el desarrollo del estriado, en el cual cambios plásticos en los niveles de neuroreceptores pueden ser producidos por la actividad motora fisiológica.

2.3. Comportamiento circular, su relación con el neostriado:

A comienzos de la década de 1980, y con la finalidad de estudiar el metabolismo normal de la dopamina en animales que desempeñan un comportamiento circular, Yamamoto y Freed (1982) desarrollaron un paradigma experimental de comportamiento condicionado. En este test, el animal motivado por la privación de agua, es estimulado a correr en una pista circular en busca de una recompensa. El animal privado de agua, 24 horas antes de la primera sesión de entrenamiento, es colocado en el tambor de entrenamiento y enseñado a correr en forma circular en un sentido asignado aleatoriamente en busca de una recompensa (solución de agua azucarada al 10 %). El animal es entrenado durante 7 días consecutivos, tiempo suficiente para que alcance un plateau en su velocidad, obteniendo un promedio de 10 a 15 vueltas por minuto, durante 20 minutos. Para estudiar el rol de la dopamina en el comportamiento circular, los animales fueron sacrificados a distintos tiempos de haber comenzado el comportamiento motor circular, y la dopamina y su metabolito ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) fueron medidos en ambos estriados. Estos resultados demostraron que la concentración de dopamina y DOPAC aumentan en el estriado contralateral al sentido de giro, mientras que en el estriado ipsilateral los valores no se modificaron significativamente (Yamamoto y Freed, 1982; Morgan y col, 1984). El aumento de dopamina es máximo a los 20

minutos de iniciado el comportamiento circular, llegando a ser un 67 % superior a los valores basales. Luego va disminuyendo en forma paulatina y paralela a la disminución en la velocidad. Esta es la primera evidencia de la participación fisiológica de la dopamina en el comportamiento circular (Yamamoto y Freed, 1982).

Posteriormente estos mismos autores observaron que la dopamina también se incrementaba en el núcleo accumbens contralateral al sentido de giro en un porcentaje similar al registrado en el cuerpo estriado. Conjuntamente con el incremento en la liberación de dopamina durante la sesión de entrenamiento se describió un aumento en la actividad de la enzima tirosina-hidroxilasa, enzima esencial en la síntesis de dopamina. El aumento de esta actividad también se evidenció en el estriado contralateral al sentido de giro. El incremento en la actividad enzimática comienza poco después de iniciado el entrenamiento y alcanza el pico de actividad alrededor de los 20 minutos después de comenzado el entrenamiento (Morgan y col, 1984).

La participación de la dopamina en el comportamiento motor en animales intactos fue confirmada utilizando otro paradigma experimental. En este caso el animal es puesto a correr en forma forzada sobre un disco giratorio o sobre una cinta sin fin de movimiento continuo. En todos los casos el animal es obligado a correr en busca de un reforzador, el cual nunca alcanza. Este paradigma fue diseñado para estudiar la relación entre intensidad, postura, y dirección del movimiento con la magnitud de la liberación de dopamina en el neostriado y núcleo accumbens. Los resultados obtenidos mostraron que cuando el animal corre derecho, la concentración de dopamina libre y DOPAC aumenta en ambos estriados y núcleos accumbens en función de la velocidad. Si el animal es obligado a correr en círculos también se observa un aumento en la dopamina libre en ambos núcleos, en relación con la velocidad de giro, siendo mayor en el estriado contralateral (Freed y Yamamoto, 1985). En concordancia con éstos resultados, la actividad de las células dopaminérgicas de la sustancia nigra medida por la frecuencia de despolarización o disparo, aumenta bilateralmente como consecuencia de la locomoción forzada en un disco giratorio (Diana y col, 1989). Estudios posteriores, realizados por los mismos autores que originalmente describieron la lateralización en la concentración de dopamina evocada por la estimulación motora circular y por otros laboratorios, no pudieron confirmar dicha lateralización al utilizar métodos de medición *in vivo* de la concentración de dopamina (Sabol y col., 1990). Si bien no hay acuerdo en la existencia

de una lateralización en el aumento de la liberación y metabolismo de dopamina, en lo que si existe acuerdo es en que la concentración de dopamina libre y de DOPAC aumentan en el estriado como consecuencia del comportamiento motor, independientemente de que sea mayor en un hemisferio que en el otro (Sabol y col, 1990; Schwarting y Huston, 1987).

En resumen, existen suficientes evidencias de que el comportamiento circular en animales intactos inducidos a correr por un condicionamiento operante o forzadamente en un disco giratorio evoca una estimulación de las vías dopaminérgicas hacia el estriado, representado por a) un aumento en la cantidad de disparos de las células dopaminérgicas, b) un aumento en la concentración de dopamina libre y de su metabolito DOPAC, y c) un incremento en la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa en el estriado.

2.4. El comportamiento rotatorio como vía de inducción de cambios plásticos:

El comportamiento motor rotatorio puede ser inducido luego de lesionar unilateralmente las proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales de la rata por medio de la inyección estereotáxica de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Ungerstedt, 1968). Estudios posteriores utilizando agonistas y antagonistas dopaminérgicos permitieron confirmar la participación de éstas dos estructuras de los ganglios basales y de los imbalances dopaminérgicos en el comportamiento motor (Von Voightlander y Moore, 1973; Christie y Crow, 1971; Glick y col., 1976; Ungerstedt, 1971; Pycock, 1980; Chen y col, 1991). Por otra parte, se han estudiado los cambios plásticos que ocurren en el cuerpo estriado como consecuencia de la deafferentación nigroestriatal. Estas alteraciones involucran cambios plásticos en la densidad y en los niveles de receptores dopaminérgicos (Qin y col.).

2.5. Pruebas para el estudio del comportamiento motor:

En los trabajos de plasticidad visual, los cambios neuroquímicos y morfológicos son evaluados como consecuencia de una estimulación sensorial (estimulación lumínica). En forma análoga; el estudio de la plasticidad motora requiere de una estimulación motora, la cual a través de la activación de circuitos neuronales, podrá generar cambios plásticos en las estructuras relacionadas. Una gran variedad de pruebas motoras han sido desarrolladas para el estudio de la plasticidad y función motora. Las pruebas motoras pueden clasificarse en pruebas **apicales** y **no apicales**. Las **no apicales** evalúan comportamientos específicos que reflejan la función de un área particular del cerebro. Contrariamente, las pruebas **apicales** involucran varias regiones cerebrales, e involucran diferentes tipos de aprendizajes, funciones sensoriales y participación de componentes de destreza motora. De esta forma, el SNC debe integrar el funcionamiento de las distintas estructuras intervinientes, para poder desarrollar exitosamente la prueba conductual.

Las pruebas utilizadas para el estudio del comportamiento motor deben reunir ciertas características (Brusés y Azcurra, 1993; Vorhees, 1987; Geyer, 1990). La prueba ideal debería considerar: **(a)** medición cuantitativa del desarrollo de la prueba; **(b)** poder evaluar independientemente o bajo distintas variables a los diferentes procesos neuronales superiores que participan durante el desarrollo del test (ej: aprendizaje asociativo, destreza motora); **(c)** la prueba debe ser objetiva y reproducible, es decir independiente del experimentador. En este sentido la recolección automatizada de datos resulta apropiada; **(d)** la duración de la prueba debe ser lo suficientemente extensa (más de 10 minutos) como para minimizar los factores emocionales y el comportamiento exploratorio innato, pero en lo posible no debe exceder los 30 minutos para minimizar los efectos del agotamiento físico y de la pérdida de motivación por la actividad; **(e)** la respuesta comportamental debe inducir una actividad neurofisiológica medible, de manera que el comportamiento motor pueda ser correlacionado con parámetros neuroquímicos y neurofisiológicos.

En el presente trabajo se emplearon dos tipos diferentes de pruebas motoras, las cuales son descritas a continuación. En particular, la sistematización del test de entrenamiento circular (TEC), llevada a cabo en nuestro laboratorio, permitió demostrar que el TEC es una prueba motora que sirve específicamente para el estudio neuroquímico plástico de las estructuras cerebrales involucradas en el comportamiento motor (Ibarra y col, 1995;

Ibarra y col, 1996) y para la detección de neuroteratología funcional (Brusés y col, 1991; Brusés y Azcurra, 1993).

2.5.1. Test de entrenamiento circular (TEC):

El test de entrenamiento circular es una prueba de comportamiento condicionado operante, en el cual las ratas son privadas de agua (24 horas antes de comenzar el test) y entrenadas a girar en sentido horario o antihorario en busca de una recompensa. Este modelo fue inicialmente desarrollado por Yamamoto y Freed (1982), para el estudio del metabolismo dopaminérgico durante la actividad motora. Debido a las características asimétricas de la estimulación motora circular, éste test permite estudiar el rol de la lateralidad cerebral en la función motora y asociativa. El TEC permite evaluar la destreza motora de los animales, registrando la distancia recorrida y la velocidad desarrollada por los mismos durante la prueba. Además, por ser una prueba que involucra un comportamiento condicionado con participación de un aprendizaje asociativo espacial, el TEC permite evaluar esta componente conductual a través del registro de número de errores (cambios al sentido de giro no recompensado). Es importante mencionar que en esta prueba también deben considerarse los procesos neuronales relacionados con la motivación y la recompensa.

2.5.2. Test de plataforma giratoria (TPG):

En este test las ratas colocadas sobre un disco giratorio en movimiento desarrollan un patrón de actividad locomotora voluntaria, en el sentido contrario al que gira dicha plataforma. El uso del test de plataforma giratoria fue descrito por primera vez por Richter y Wang (1926). A diferencia del TEC el TPG no es un test de comportamiento condicionado, por lo que el estudio de la plasticidad motora es independiente de la plasticidad relacionada con el aprendizaje asociativo y la motivación por la recompensa. Este test también permite evaluar el grado de estimulación motora, registrando la distancia recorrida y determinando la velocidad desarrollada por los animales durante la prueba.

3. EL CUERPO ESTRIADO EN EL ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD

3.1. Elección del cuerpo estriado para el estudio de plasticidad:

El comportamiento motor es consecuencia de una activación neuronal compleja, en la que intervienen distintas estructuras del SNC. El estudio temporo-espacial de las distintas estructuras involucradas durante un aprendizaje motor ha sido realizado llevando a cabo mediciones regionales de flujos sanguíneos cerebrales (FSC) con tomografía de emisión positrónica (PET) (Seitz y col, 1990). Estos estudios determinaron las estructuras anatómicas del cerebro humano involucradas durante el aprendizaje de una habilidad motora. Estas investigaciones demostraron que las estructuras anatómicas que participan en la secuencia de aprendizaje motor pertenecen a dos clases de estructuras. Primeramente se encuentran las que asisten a las áreas motoras, proveyéndoles de información somatosensorial y otras informaciones relevantes en la fase temprana del aprendizaje. Estos cambios iniciales reflejan activaciones y desactivaciones de estructuras anatómicas que participan en el programa y en el control motor. Finalmente se encuentran un segundo tipo de estructuras que modulan su actividad durante el curso del aprendizaje. Estos sectores son parte de un circuito córtico-cerebelar y córtico-estriatal. Ambos circuitos pertenecen a las estructuras donde se almacena el programa motor final.

Las estructuras con actividad sináptica durante el desempeño motor deben contener a las poblaciones sinápticas que han sido modificadas o seleccionadas durante el proceso plástico de aprendizaje, como fue discutido en el capítulo anterior.

Además de ejercer un rol fundamental en el control motor y en el aprendizaje de ejercicios motores, existe entre los neurobiólogos posturas contrapuestas acerca de la participación del cuerpo estriado en funciones cognitivas. Dentro del perfil del presente trabajo, el cuerpo estriado sirve como área cerebral blanco para el estudio de la plasticidad neuroquímica relacionada con las funciones cognitivas y motoras. Además el estriado es una estructura cerebral apropiada para estudios neuroquímicos dado que es un área anatómicamente bien definida y fácil de disectar, cuyo tamaño provee suficiente

muestra de tejido para realizar análisis bioquímicos. En la rata, la maduración funcional del estriado sucede durante las primeras cuatro semanas de vida postnatal (Coyle y Campochiaro, 1976).

3.2. El cuerpo estriado y su relación con la actividad motora:

Evidencias clínicas y experimentales demuestran claramente la importancia del cuerpo estriado en el comportamiento motor. Diferentes patologías motoras como son la enfermedad de Parkinson y la Corea de Huntington afectan profundamente al cuerpo estriado (Penney y Young, 1983; Carlsson y Carlsson 1990; Albin y col, 1989; Wichmann y DeLong, 1993). Los estudios descritos en el capítulo anterior utilizando PET también demuestran la participación del estriado en la actividad motora (Seitz y col, 1990). Por otra parte se describió que en ratas deprivadas neonatalmente de dopamina el aprendizaje de actividades motoras, que involucran las extremidades anteriores, no fue satisfactorio (Whishaw y col, 1994). Lo mismo se observó en animales que recibieron una inyección unilateral de 6-OH dopamina (Nikkhah y col, 1993). También se observó que el tratamiento con estimulantes (AMPH, cocaína), que involucran la activación del sistema dopaminérgico estriatal, produce una sensibilización del comportamiento locomotor (Gnegy y col, 1993; Segal y col, 1980; Roberts y col., 1992)

3.3. El cuerpo estriado y su relación con los procesos cognitivos o asociativos:

Si bien resulta aún poco claro cuáles son las funciones cognitivas o asociativas del estriado, existen evidencias de su participación en estas funciones. El estriado presenta conexiones con áreas corticales asociativas prefrontales. Además la coexistencia de trastornos en funciones cerebrales superiores como memoria y emoción han sido observadas en las enfermedades de Parkinson y Huntington. Drogas de acción central como los neurolépticos utilizados en el tratamiento de trastornos mentales, tienen sitios de acción en el neostriado. Estudios realizados por Stewart y col (1996) demostraron un aumento bilateral significativo (comparado con los animales controles) en la

capacidad de unión a receptores dopaminérgicos D1, pero no a D2, en el lóbulo paraolfatorio (LPO) del estriado de pollo. Estos cambios ocurrieron luego de realizar un entrenamiento de evitamiento pasivo en el cual los pollos desarrollaron una respuesta de rechazo hacia las semillas que habían sido revestidas con una sustancia amarga (aprendizaje aversivo). El LPO es uno de los principales componentes del complejo paleoestriatal de las aves y es equivalente al estriado del mamífero (Dubbledam 1991; Reier 1984). En esta región estriatal equivalente al caudado-putámen de mamíferos, estudios previos también demostraron que el entrenamiento de evitamiento pasivo produce cambios sinápticos y dendríticos (Hunter y Stewart, 1993). Además lesiones bilaterales post entrenamiento causan amnesia para la respuesta de evitamiento (Gilbert y col, 1991). Si bien esto puede representar un área relacionada con memoria los autores no descartan que las modificaciones puedan estar relacionadas con los circuitos neuronales conectados con la tarea de evitamiento o modificaciones de la respuesta de picoteo.

3.4. El cuerpo estriado y los mecanismos comportamentales de recompensa y motivación:

El cuerpo estriado es una estructura relacionada con la motivación a través de su participación en el sistema límbico (Robbins y Everitt, 1996). Estudios realizados en monos, demostraron que los mecanismos de recompensa y motivación están correlacionados con la actividad neuronal del cuerpo estriado y la vía nigroestriatal (Aosaki y col, 1994; Wise, 1981; Schulz y col, 1993). Otras investigaciones confirmaron la importancia del estriado en éstos procesos utilizando ratones transgénicos con déficits en el funcionamiento estriatal (Xu y col, 1994).

Finalmente existen evidencias que indican que, el efecto del estímulo en la motivación comportamental condicionada durante la realización de una prueba de entrenamiento, depende de la interacción de los sistemas glutamatérgicos y dopaminérgicos del estriado y de su conexión con los núcleos amigdalinos (Robbins, 1989).

3.5. El cuerpo estriado y su importancia clínica:

La importancia clínica del estriado está claramente manifestada en el hecho de que alteraciones en el normal funcionamiento de esta estructura se encuentra relacionada con diferentes neuropatologías, caracterizadas por déficits cognitivos y motores. Por otra parte, dada la alta concentración de diferentes receptores, el estriado se ve profundamente afectado por psicoestimulantes como la cocaína, morfina y las AMPHs (Graybiel y col, 1990; Young y col, 1991; Moratalla y col, 1993; Liu y col, 1994;).

En humanos, el abuso con AMPHs puede conducir a una psicosis que clínicamente se asemeja a una esquizofrenia paranoica y que rápidamente responde al bloqueo de los receptores dopaminérgicos (Angrist y col., 1974; Sato 1986). Un uso discontinuo de la droga genera que igualmente los individuos permanezcan hipersensibles a los efectos de ésta por algunos años (Janowsky y Risch, 1979; Snyder, 1973; Benes y col, 1985). Indudablemente, éstos cambios conductuales de largo plazo son consecuencia de cambios en los sistemas de recepción y transducción de señales y en la normal expresión de los programas genéticos. Tanto la cocaína, la morfina y las AMPHs disparan la expresión de los proto-oncogenes c-fos y jun-B en el cuerpo estriado (Graybiel y col, 1990; Young y col, 1991; Moratalla y col, 1993; Liu y col, 1994). Por lo tanto estos genes involucrados en procesos plásticos cerebrales, estarían involucrados en los cambios plásticos de largo plazo relacionados con sensibilización conductal. Los neurofármacos son drogas utilizadas para controlar distintas afecciones neurológicas. Así por ejemplo, el Haloperidol (antagonista dopaminérgico) es un potente neuroléptico que es utilizado como antipsicótico . Repetida administración de éste fármaco produce alteraciones en la ultraestructura de las neuronas estriatales (Benes y col, 1985; Kerns y col, 1992; Klitzova y col, 1989). De esta manera, comprender los mecanismos plásticos que operan en el estriado permitirá comprender mejor los efectos de estos psicoestimulantes.

4. EL CUERPO ESTRIADO. ESTRUCTURA Y FUNCION.

4.1. Organización anatómico-funcional del cuerpo estriado:

El cuerpo estriado, constituido por el núcleo caudado y el putámen (neostriado), conforma la principal estructura de los ganglios basales. Conjuntamente con el globo pálido (paleostriado), la amígdala (arquiestriado) y el núcleo subtalámico conforman los ganglios basales. El cuerpo estriado se convierte en una estructura profunda dentro de los hemisferios en los mamíferos, debido al desarrollo del neocórtex y del cuerpo calloso. El núcleo caudado y el putámen son similares en estructura y conexiones, estando anatómicamente unidos en mamíferos inferiores como la rata y el ratón. Luego se van separando hasta que en el hombre se encuentran casi totalmente separados por la cápsula interna. El cuerpo estriado es una estructura altamente desarrollada en las aves, donde realiza muchas funciones similares a las que efectúa la corteza en los mamíferos, ya que además de cumplir con funciones motoras, mantiene estrechas conexiones con las principales vías asociativas del cerebro de las aves (ecoestriado e hiperestriado). El cuerpo estriado es una estructura altamente desarrollada en las aves donde realiza muchas funciones similares a las que efectúa la corteza en los mamíferos, ya que además de cumplir funciones motoras mantiene estrechas conexiones con las principales áreas asociativas del cerebro de las aves (Sarnat y Netsky, 1976).

El neostriado recibe dos aferencias principales, una de la corteza cerebral por medio de las fibras corticoestriatales y otras de la sustancia nigra pars compacta por medio de las fibras nigroestriatales (Figura 1). Por medio de las proyecciones corticoestriatales, que desde el punto de vista de la neurotransmisión son fibras glutamatérgicas excitatorias, llegan al estriado proyecciones desde casi toda la corteza cerebral, incluyendo áreas motoras, sensoriales, asociativas y límbicas. Estas proyecciones se encuentran organizadas topográficamente de acuerdo a las funciones en que participan. Por lo tanto las áreas corticales asociativas, sensorimotoras y límbicas proyectan en forma segregada a diferentes regiones del cuerpo estriado, referidas como áreas estriatales asociativas, sensorimotoras y límbicas respectivamente (Parent, 1990). Esta parcelación indica una organización espacial del procesamiento de información que recibe el estriado.

A su vez del cuerpo estriado emergen dos vías eferentes gabaérgicas. Estas fibras son las estriatonigrales que conectan con la sustancia nigra pars compacta y reticulada, y las

fibras estriatopalidales que proyectan hacia el globo pálido. Es a través del globo pálido por donde se producen las eferencias de los ganglios basales hacia los núcleos del tálamo.

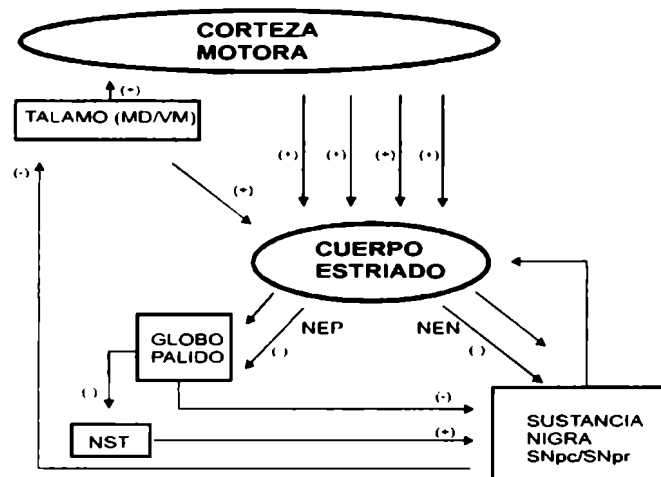


Figura 1: Representación esquemática de las principales vías aferentes y eferentes del cuerpo estriado.

La corteza motora envía proyecciones excitatorias de tipo glutamatérgicas (·) y a las neuronas gabaérgicas proyectivas del cuerpo estriado (espinosas medianas), las cuales pueden clasificarse en dos tipos diferentes de poblaciones neuronales de acuerdo a sus sitios de proyección. Neuronas estriatopalidales (NEP) y neuronas estriatonigrales (NEN), que proyectan al globo pálido y a la sustancia nigra respectivamente. Ambos tipos de proyecciones utilizan GABA como neurotransmisor (transmisión inhibitoria, (-)). Tanto las NEP como las NEN presentan una distribución homogénea a lo largo de todo el cuerpo estriado. A su vez las proyecciones NEN se subdividen en aquellas que proyectan a la sustancia nigra pars compacta (SNpc) o a la sustancia nigra pars reticulata (SNpr). Además, las neuronas gabaérgicas del globo pálido aportan proyecciones inhibitorias al núcleo subtalámico (NST) y a la SNpr. Por su parte la sustancia nigra envía proyecciones dopaminérgicas inhibitorias al tálamo (en particular a los núcleos dorsomedial y medioventral, el cual envía fibras glutamatérgicas excitatorias a la corteza cerebral, cerrando de esta manera el circuito. También a través de fibras dopaminérgicas, la sustancia nigra ejerce una acción regulatoria

sobre el cuerpo estriado actuando sobre los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Finalmente el tálamo envía proyecciones glutamatérgicas al cuerpo estriado, y los núcleos intralaminares ventral lateral (no representado) y medio ventral participan en la transferencia de información interhemisférica.

El tálamo a su vez proyecta hacia la corteza por medio de las fibras tálamocorticales, cerrando así el circuito de los ganglios basales y la corteza cerebral. Por último, el circuito funcional se cierra con el feedback nigroestriatal de fibras dopaminérgicas desde la sustancia nigra pars compacta nuevamente hacia el estriado (Gerfen, 1992 a; Gerfen, 1992 b) Las conexiones aquí resumidas son las principales proyecciones de los circuito donde interviene el estriado. Otras conexiones menores son las eferencias nigrotalámicas que conectadas con el núcleo intralaminar realizan la retroalimentación del estriado (Gerfen, 1992 a), las interconexiones entre los hemisferios izquierdo y derecho de ambos caudados Medina and Pazo, 1981) y entre las conexiones que permiten la regulación recíproca entre las 2 vías dopaminérgicas nigroestriatales (Leviel y col, 1979).

4.2. Organización neuronal del estriado:

Desde el punto de vista histológico, el neostriado es una estructura cerebral homogénea en cuanto a los tipos neuronales que la componen. El estriado de rata está compuesto por neuronas proyectivas (12-20 μm , neuronas espinosas medianas) e interneuronas locales en una relación 9:1 respectivamente. Las neuronas proyectivas se caracterizan por irradiar 4 a 5 dendritas primarias que se adelgazan y presentan gran cantidad de especializaciones de sus membranas, las cuales se conocen como espinas dendríticas. Sus axones emiten fibras colaterales antes de dejar el cuerpo neuronal, las cuales se arborizan abundantemente y le permiten participar en los circuitos internos del estriado mediante la formación de sinápsis con otras neuronas proyectivas vecinas. Un segundo tipo de arborización (menos frecuente) consiste en una arborización mayor y más extensa que va más allá de la neurona de origen, con la cual normalmente no interacciona. Todas estas neuronas espinosas medianas se caracterizan por utilizar ácido

gama-aminobutírico (GABA) como neurotransmisor principal, y por co-expresar algunos de los siguientes neuropéptidos: sustancia P, encefalina y dinorfina. Estos péptidos permiten definir subgrupos neuronales particulares

El segundo tipo neuronal que compone al estriado son las interneuronas, las cuales se caracterizan por la ausencia o rareza de espinas en sus dendritas. Desde el punto de vista morfológico las interneuronas pueden agruparse en dos amplias categorías morfológicas: a) las interneuronas no espinosas gigantes y b) las interneuronas no espinosas medianas . Las interneuronas gigantes (20-60 μm de diámetro) utilizan acetilcolina como neurotransmisor y presentan pocas dendritas, que interaccionan ampliamente mediante ramificaciones radiales. Estas neuronas pueden ser reconocidas específicamente a través de la detección de la enzima colina-acetiltransferasa (ChAT) (Kaguaguchi y col., 1995; Di Figlia y col., 1976; Phelps y col., 1985). Por otra parte, las interneuronas medianas utilizan GABA como neurotransmisor y se dividen en 3 categorías en base a métodos inmunohistoquímicos (Kaguaguchi y col., 1995; Di Figlia y col., 1976).

4.3. Conexiones neuronales del estriado:

Cada una de las conexiones de los ganglios basales entre sí y con otras estructuras involucran neurotransmisores específicos. Las vías aferentes que llegan de la corteza al neostriado utilizan glutamato como neurotransmisor, mientras que las fibras provenientes de la sustancia nigra son dopaminérgicas. Existen dos vías que van a través de los ganglios basales. La vía directa que proyecta desde el neostriado a la porción interna del globo pálido y a la pars reticulada de la sustancia nigra, que posteriormente proyectan al tálamo. La transmisión de éstas eferencias directas del neostriado es mediada por GABA y sustancia P. La vía indirecta establece un circuito entre las fibras que proyectan del neostriado a la porción externa del globo pálido, que a su vez proyecta hacia el núcleo subtalámico, el cual proyecta nuevamente hacia el globo pálido y la sustancia nigra. Estas transmisiones están mediadas por GABA (Côté y Crutcher, 1991). La actividad del neostriado está mediada por interneuronas colinérgicas y gabaérgicas. Existen evidencias de que las neuronas nigroestriatales hacen contacto fundamentalmente

con las neuronas colinérgicas, las que a su vez mantienen contacto con neuronas gabaérgicas, las que conforman las eferencias del neostriado (Mc Geer y col, 1978).

4.4. Ontogenia del estriado:

Como otras estructuras cerebrales, el estriado presenta distintas etapas de desarrollo hasta la conformación de la entidad funcional del adulto. Estas etapas transcurren a lo largo del desarrollo embrionario y fetal, y continúan durante cierto tiempo después del nacimiento. En especial los fenómenos relacionados con la funcionalidad de la estructura se terminan de desarrollar postnatalmente. Las distintas etapas de desarrollo y los tiempos en los que suceden son similares entre la rata y el ratón, animales de los que se dispone suficiente información como para establecer los periodos críticos del desarrollo anatómico y funcional. Además, la estrecha correlación entre los periodos críticos del desarrollo entre primates y rata, permite hacer una aproximación de lo que sucede en el hombre. En el ratón la emergencia del estriado sucede fundamentalmente durante la segunda mitad de la gestación. El pico de producción de células se encuentra entre los días 14 a 18 de la gestación (G) (Rodier, 1988). Sin embargo la división de las interneuronas estriatales tiene su pico hacia el día G21 y se extiende hasta varios días después del nacimiento (Das y Altman, 1970). Este periodo coincide con el periodo de producción de células en la corteza cerebral, que se extiende aproximadamente desde G12 hasta G18. Por otra parte, el periodo de producción de células de la otra estructura aferente principal del estriado, la sustancia nigra, sucede entre los días G10-G14 (Rodier, 1988).

Las conexiones de estas estructuras son posteriores. La sustancia nigra comienza a enviar sus axones al estriado hacia el comienzo de la tercera semana de gestación, pero los mismos no llegan al estriado hasta el día G20-G21, es decir casi hasta el nacimiento (Lauder y Bloom, 1974; Lauder y Bloom, 1975). Estas conexiones no serán funcionales hasta entrado el desarrollo postnatal.

La primera evidencia de acoplamiento funcional entre los terminales dopaminérgicos provenientes de la nigra y las interneuronas colinérgicas del estriado sucede hacia comienzos de la segunda semana de vida postnatal (PN): PN8 (Coyle y Campochiaro, 1976). En el primer día de vida la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa, presente en los terminales dopaminérgicos en el estriado es un 10 % de la actividad que se registra en

el adulto. Luego va aumentando linealmente hasta llegar a ser un 75 % de la actividad del adulto hacia fines de la cuarta semana de vida. Algo similar ocurre con la actividad de la enzima acetilcolintransferasa, enzima encargada de la síntesis de acetilcolina en las interneuronas colinérgicas. Hacia el nacimiento su actividad en el estriado es el 2 % de la actividad observada en el adulto, y va aumentando muy lentamente durante la primer semana de vida; posteriormente su actividad aumenta más rápidamente, para llegar a obtenerse un 70 % de la actividad del adulto hacia el día PN28 (Coyle y Campochiaro, 1976). Estos datos indican que la maduración funcional del estriado en la rata sucede durante las 4 primeras semanas de vida postnatal.

La cantidad de receptores dopaminérgicos en el estriado va incrementando desde el nacimiento y alcanza los niveles detectados en el adulto hacia el final del primer mes de vida (Pardo y col, 1977). Esta cantidad de receptores se puede ver significativamente modificada por la manipulación farmacológica durante períodos específicos del desarrollo.

4.5. Neuroquímica del estriado:

La activación plástica de circuitos neuronales como consecuencia de la estimulación sensorial o farmacológica, producen cambios neuroquímicos en diferentes sistemas de segundos mensajeros. De esta manera, los sistemas de transducción de señales regulan en primer instancia la transmisión sináptica a través de la modulación de la neurorecepción (Malenka y col, 1989) y neuroliberación de transmisores (Norden. y col, 1991; Ramakers y col., 1995). Debido a la compleja interconexión sináptica que caracteriza a los circuitos estriatales, el conocimiento neuroquímico de esta estructura provino a partir de la activación e inhibición farmacológica de sus principales vías de neuroreceptores. La estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 en neuronas en reposo recompone los niveles de magnesio por inactivación de corrientes lentas de potasio, eliminando de esta manera el bloqueo de los receptores de NMDA y posicionando a la neurona en un estado más eficiente para responder a la excitación glutamatérgica. Además, estudios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* demuestran que la dopamina controla la transmisión mediada por acetilcolina, facilitándola a través de los receptores D1 e inhibiéndola vía

receptores D2. En ratas, la administración de AMPH, produce sensibilización de un comportamiento locomotor e involucra activación de sistemas dopaminérgicos (Segal y col, 1980; Gnegy y col, 1993). En el estriado de rata la sensibilización conductual, por AMPH exhibe características similares a otras formas de plasticidad sináptica, tales como LTP y procesos de consolidación de memoria de tipo aversiva. Ellos involucran cambios plásticos de larga duración, aumento de la liberación de neurotransmisores, su inducción es bloqueada por antagonistas de receptores de NMDA y producen aumento en la fosforilación endógena de la proteína GAP-43 en el sitio específico de la PKC (Gnegy y col, 1993). Otras similitudes neuroquímicas entre estos modelos son los cambios observados en actividades que involucran Ca^{2+} y en la distribución subcelular de la proteína de unión a calcio/calmodulina (Popov y Matthies, 1989). Finalmente, el papel del receptor dopaminérgico D2 (preferencialmente presináptico) sería inhibir la liberación de dopamina sobre el cuerpo estriado, funcionando como autoreceptor. También modula como heteroreceptor la liberación de acetilcolina y glutamato.

Estudios combinando localización inmunohistoquímica de la enzima Colina acetiltransferasa (ChAT) con hibridización *in situ* del mensajero de la proteína GAP-43, demostraron que las interneuronas colinérgicas del estriado expresan altos niveles de mRNA de GAP-43 en relación a regiones no colinérgicas, las cuales expresan altos niveles de este mensajero (Mc Kinney y Kent, 1994). Sin embargo, la expresión de la proteína GAP-43 en las neuronas colinérgicas estriatales es altamente heterogénea. Esto sugiere que las respuestas plásticas en las poblaciones de interneuronas del estriado puede no ser uniforme. Estos datos sugieren un posible rol de esta proteína de plasticidad en la función colinérgica. La acetilcolina liberada por las interneuronas colinérgicas, a través de sus receptores localizados principalmente sobre las neuronas proyectivas, producen una importante modulación de la actividad funcional de las eferencias del estriado (Di Chiara y col, 1994). La neurotransmisión colinérgica ejerce complejas influencias actuando a través de sus diferentes subtipos de receptores, los cuales a su vez se encuentran asociados a diferentes mecanismos de segundos mensajeros. La transmisión glutamatérgica, representada por las fibras aferentes corticoestriatales, también es de tipo moduladora sobre la liberación de acetilcolina estriatal (Scatton y Lehmann, 1982). La transmisión a través de este receptor está tónicamente inactivada en las neuronas proyectivas medianas. Contrariamente las

interneuronas colinérgicas, las cuales se encuentran activas y despolarizadas en condiciones basales, pueden ser moduladas por las fibras glutamatérgicas corticales.

A su vez, la activación de vías específicas de transducción de señales posibilitaría el disparo transcripcional de ciertos genes de transcripción temprana, los cuales dirigirán finalmente la respuesta neuronal plástica, modificando la transcripción de ciertos genes blanco en el SNC. Se ha descrito que entre los genes de transcripción temprana, el proto-oncogén c-fos estaría involucrado en plasticidad neuronal (Morgan y col, 1987; Morgan y Curran, 1991; Sheng y Greenberg, 1990). Su inducción se inicia inmediatamente ante una amplia variedad de estímulos, como activación colinérgica (Greenberg y col, 1986), stress térmico (Abbadie y col, 1994) e hídrico (Sagar y col, 1988), factores tróficos (NGF, FGF, PDGF) (Curran y Morgan, 1985; Kohmura y col, 1995; Cochran y col, 1984) por la acción de convulsivantes como el metrazol (Morgan y col, 1987). La activación de PKC es requerida para la inducción de genes de transcripción temprana entre los que se encuentra el c-fos. Estudios posteriores utilizando anticuerpos específicos contra diferentes isoenzimas de PKC, han demostrado que todas las neuronas fos + expresan γ -PKC en el estriado de pollo, durante el imprinting (Ambalavanar y col, 1993).

En estriado de rata la activación del c-fos está mediada por activación de receptores D1 en neuronas que contienen sustancia P y proyectan a la sustancia nigra. A su vez el receptor colinérgico muscarínico inhibe esta estimulación a través de la activación del subtipo M4. Contrariamente en neuronas encefalina + que proyectan al globo pálido, el receptor muscarínico M1 activa la expresión del c-fos, mientras que los receptores dopaminérgicos D2 inhiben esta estimulación (Robertson y col., 1992; Bernard y col, 1993; Morelli y col, 1993).

5. El sistema de fosforilación GAP-43/PKC en plasticidad sináptica y neuronal.

5.1. Sistema de fosforilación de proteínas

La fosforilación de proteínas es una vía común de fundamental importancia en la regulación biológica. Virtualmente, todos los tipos de señales extracelulares, dentro y

fuera del sistema nervioso, producen algunos de sus efectos biológicos regulando el estado de fosforilación de fosfoproteínas específicas dentro de la célula blanco. Además se ha demostrado que muchas funciones neuronales que incluyen el metabolismo intermedio, la excitación neuronal, la síntesis y liberación de neurotransmisores. El crecimiento neuronal, la diferenciación y la morfología celular están mediados por la fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas. (Wallas y Greengard, 1991; Girault, 1993; Nestler y Greengard, 1994). La fosforilación de proteínas de membrana es un importante mecanismo en la regulación pre y post sináptica en el sistema nervioso (Gordon y col, 1977; Williams M y Rodnight R., 1977; Greengard, 1979). Una amplia variedad de experiencias comportamentales han descrito cambios en la fosforilación de proteínas en cerebro de ratas a través de ensayos in vivo (Souza y col, 1980) e in vitro (Eherlich y col, 1977; Conway y Routtenberg, 1978; Morgan y Routtenberg, 1980) realizados luego de llevar a cabo procedimientos de entrenamiento específicos.

Un sistema de fosforilación consiste en una proteína kinasa, una proteína sustrato y una fosfatasa. La proteína sustrato es fosforilada por la proteína kinasa que cataliza la transferencia del fosfato y del ATP al grupo OH de un aminoácido específico, y es convertida nuevamente en su forma desfosforilada por una fosfatasa que hidroliza la unión fosfoéster (Wallas y Greengard, 1991; Girault y col, 1993). La fosforilación de proteínas altera la carga neta de la proteína, ya que los grupos fosfatos están cargados negativamente, y de esta manera puede alterar la conformación y finalmente la función de la proteína sustrato. Es importante considerar que, cambios en el estado de fosforilación de una proteína pueden ocurrir a través del aumento o disminución de la actividad de kinasas y/o fosfatasas.

5.2. Clasificación de Proteínas Kinasas

Muchas de las proteínas kinasas identificadas hasta el momento, pertenecen a una superfamilia de enzimas que comparten similitudes en su dominio catalítico (Hanks y col, 1988, Wallas y Greengard, 1991). Estas proteínas difieren en su distribución celular y subcelular, especificidad de sustratos y generalmente son clasificadas como: kinasas de serina/treonina, fosforilan proteínas en residuos de serina o threonina; o tyrosina kinasas,

que fosforilan proteínas en residuos tyrosina (Girault, 1993). Recientemente se ha descrito un tercer grupo de kinasas capaz de fosforilar los tres tipos de aminoácidos (Lindberg y col al, 1992).

En el cerebro se han descrito varias kinasas de serina/treonina, las cuales pueden ser clasificadas en base a su regulación por segundos mensajeros. Los principales activadores son: AMP cíclico (cAMP), GMP cíclico (cGMP), Ca^{++} y diacilglicerol (DAG) (Hunter y Safton, 1991). cAMP activa kinasas dependiente de cAMP (PKA), mientras que cGMP activa kinasas dependiente de cGMP (PKG). El calcio ejerce su efecto junto con la proteína calmodulina (CAM) activando kinasas dependiente de Ca^{++} /Calmodulina (CaMK), o junto con DAG y fosfatidilserina (PS), activando proteína kinasa dependiente de Ca^{++} /DAG (PKC) (Nishizuka y col, 1986). Además en cerebro existen otras kinasas que no están reguladas directamente por segundos mensajeros, entre ellas la Caseína Kinasa I y II, y la MAP kinasa I, II y III, cuyos mecanismos de acción aún no se conocen bien.

Entre las proteínas tirosina kinasas se incluye a los receptores para insulina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y algunos productos de proto-oncogenes, por ejemplo src kinasa (Ross y col, 1988). La tabla 1 muestra la clasificación de las proteína kinasas según los residuos que ellas fosforilan, su modo de activación. Algunas kinasas tienen una amplia especificidad de sustrato y participan en numerosas acciones fisiológicas de señales extracelulares, estas incluyen PKA, CAM kinasa II y PKC.

Si bien una gran variedad de kinasa han sido descritas en cerebro, existen evidencias que sugieren que PKC cumpliría un rol importante en la regulación de la plasticidad cerebral.

Kinasas de Serina/Treonina	Kinasas de Tirosina	Kinasas de Serina/Treonina/Tirosina
<p>Activadas por segundos mensajeros</p> <p>-cAMP: Kinasas dependiente de cAMP (PKA)</p> <p>-cGMP: Kinasas dependientes de cGMP (PKG)</p> <p>-Ca²⁺/CAM: Kinasas dependientes de Ca²⁺/CAM (CAMKI/II/III)</p> <p>-Ca²⁺ ± DAG: Proteína Kinasa C (PKC)</p> <p>Activadas por modificaciones covalentes de la enzima</p> <p>-Fosforilasa Kinasa</p> <p>-p34_{cdc2}</p> <p>No activadas por segundos mensajeros (regulación desconocida)</p> <p>Cascina Kinasa (CKI y CKII)</p> <p>MAP Kinasa (MAP1/2/3)</p>	<p>Receptores transmembrana (Activación mediada por unión del ligando)</p> <p>Receptores Para: Insulina</p> <p>EGF</p> <p>PDGF</p> <p>NGF</p> <p>Receptores que no son transmembrana (activados por fosforilación)</p> <p>Familia de Kinasas Src (PP60^{c-src})</p>	<p>Activadas por fosforilación</p> <p>ej: Kinasa activada por mitógenos</p>

Tabla 1: Clasificación de proteínas Kinasas de acuerdo a los residuos aminoacídicos que fosforilan y su forma de activación (Girault, 1993)

5.3. PKC: isoenzimas, localización y función

La PKC es una serina/treonina kinasa que fue descrita por primera vez por Nishizuka y col. en 1977 como una proteína kinasa de histona activable por Ca^{2+} , fosfolípidos y DAG.

Esta enzima, clave para los procesos de transducción de señales, es activada a través de receptores que estimulan el recambio de fosfoinosítidos (Berridge, 1984; Strosberg, 1991; Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1988). Receptores para aminoácidos excitatorios (AAE) y ciertos subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina (M1, M3 y M5) pueden generar 1,4,5 inositol trifosfato (IP_3) y DAG. Además el IP_3 puede contribuir a incrementar el nivel intracelular de calcio, movilizándolo a partir de almacenamientos intracelulares (Tanaka y Nishizuka, 1994). Este calcio intracelular conjuntamente con el DAG pueden activar PKC, translocando la enzima desde el citosol a la membrana (Nishizuka, 1986; Nixon y Sihag, 1991; Wieloch y col., 1991). También se ha observado traslocación desde membrana a citosol y a citoesqueleto (Padmaperuma y col, 1996).

La PKC es además el principal receptor para ésteres de forbol promotores de tumores (TPA), los cuales la activan in vitro en forma similar al DAG (Bell y Buns, 1991). Los ésteres de forbol han sido ampliamente utilizados como una herramienta farmacológica para investigar la función de la PKC en diferentes procesos celulares tales como: excitabilidad neuronal y liberación de neurotransmisor (Nishizuka, 1986; Kaczmarek, 1987), crecimiento y supervivencia neuronal (Hsu, 1985; Montz y col., 1985) y regulación de la expresión génica (Angel y col., 1987). La activación de esta enzima en células nerviosas está asociada a la modulación de canales iónicos (Shermann y co, 1989), desensibilización de receptores (Huganir y Greengard, 1987), aumento de la liberación de neurotransmisor (Dekker y col., 1991) y modulación de la transmisión sináptica. De esta forma PKC estaría involucrada en los mecanismos moleculares que subyacen algunas formas de aprendizaje y memoria (Colley y Routtenberg, 1993)

La PKC es una familia de proteínas de estructuras similares pero con características enzimáticas diferentes. Hasta el momento se han identificado en mamíferos 12

subespecies. (α , β I, β II, γ , δ , θ , ϵ , η , ζ , ι , λ y μ). Estas isoformas poseen distintas características, se expresan en distintos tejidos y tienen distinta localización subcelular.

El primer grupo, **cPKC**, consiste en 4 isoenzimas **clásicas** (α , β I, β II, γ) que poseen 4 regiones de secuencia conservada (C1-C4) conjuntamente con 5 regiones de secuencia variable (V1-V5). Entre las regiones conservadas C1 es esencial para la unión al éster de forbol, C2 parece ser importante para la sensibilidad de la enzima al Ca^{++} , mientras que C3 contiene el dominio catalítico. La región C4 parece ser necesaria para el reconocimiento de la proteína sustrato (Tanaka y Nishizuka, 1994). El **nuevo** grupo, **nPKC**, consiste de 4 tipos de PKC: δ , θ , ϵ , η aisladas posteriormente (Ono y col, 1988; Osada y col, 1990,1992; Liyanage y col, 1992). Estas isoenzimas carecen de la región C2 por lo tanto no requieren Ca^{++} para ser activadas por PS, DAG y ésteres de forbol (Ono y col, 1988; Konno y col, 1989; Bacher y col, 1991). Es posible que este grupo de isoenzimas sea activado in vivo por DAG, aún cuando las concentraciones de Ca^{++} retornan a los niveles basales (Tanaka y Nishizuka, 1994). Una nueva isoenzima recientemente identificada μ parece ser miembro de esta subfamilia. El tercer grupo, **aPKC**, **atípico** en mecanismo de activación, consiste de tres isoenzimas: ζ , ι , λ las cuales fueron aisladas recientemente y aún no están completamente caracterizadas. Este grupo carece de las regiones C1 y C2, son dependientes de PS pero no son afectadas por el Ca^{++} , los ésteres de forbol ni por el DAG (Ono y col., 1988, 1989; Nakanishi y Exton, 1992).

Todas las isoformas de PKC dependientes de Ca^{++} sufren autofosforilación, cuyo rol fisiológico es poco claro (Ohno y col., 1990). Por ejemplo, para la PKC α han sido descritos al menos 3 fosfositios (Huang y col., 1986; Marais y Parker 1989). La PKC β puede ser fosforilada por CK II y se ha propuesto que esta fosforilación puede regular la actividad de la PKC (Tominaga y col, 1991).

Hasta el momento se cree que las distintas isoformas de PKC responden en forma diferente a varias combinaciones de Ca^{++} , DAG y/o fosfolípidos produciendo distintos patrones de activación con respecto a su duración, localización subcelular y especificidad de sustrato (Tanaka, 1993; Tanaka y Nishizuka 1994).

En la tabla 2 se muestra la localización de las diferentes isoenzimas de PKC encontradas en cerebro.

Areas Cerebrales	α	βI	βII	γ	ϵ
Corteza	Células Piramidales/ No piramidales	Células No piramidales	Células Piramidales	Células Piramidales	Terminales Nerviosos
Hipocampo	Células Piramidales (CA1-CA3) Interneuronas		Células Piramidales	Células Piramidales. Células Granulares.	Células Piramidales Fibras Mossy Via Perforante Colateral Schaffer
Estriado	Neuronas Colinérgicas	Neuronas GABAérgicas (intrínsecas)	Neuronas GABAérgicas (proyectivas)	Células de tamaño medio	Terminales Nerviosos
Sustancia nigra	Neuronas Dopaminérgicas	No Dopaminérgicas	Terminales GABAérgicas	Terminales Nerviosos	Terminales Nerviosos
Corteza Cerebelar	Células Basket y Stellata Fibras ascendentes	Células Basket y Stellata	Fibras paraleleas	Células Basket, Stellata y de Purkinje Células de Golgi	Fibras paraleleas

Tabla 2: Localización de las diferentes isoenzimas de PKC descritas en las distintas áreas cerebrales (Tanaka y Nishizuka, 1994).

En la tabla 3 se muestra la localización intracelular de las isoenzimas de PKC en neuronas. La γ PKC se expresa únicamente en el cerebro y médula espinal (Saito y col, 1988), y ha sido encontrada principalmente en células piramidales corticales, células granulares y piramidales del hipocampo y en células cerebelares de Purkinje. En sinapsis

hipocampales la γ PKC puede estar restringida a las espinas dendríticas postsinápticas (Tanaka y Nishizuka, 1994). La isoforma β I está localizada principalmente en células no piramidales del neocortex, mientras que la β II se localiza principalmente en células piramidales y neuronas estriatales. Entre las otras isoenzimas, la α PKC tiene localización presináptica (Shermann y col., 1991), ϵ PKC se expresa principalmente en médula espinal y células piramidales hipocampales y neuronas sensoriales primarias, en estricta localización presináptica (Saito y col., 1993; Saito, 1994). La localización de las otras subespecies aún no se conoce. Estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos específicos para las distintas subespecies permitieron estudiar la localización de las isoformas de PKC en el cerebro (Nishizuka 1988; Saito 1994; Tanaka y Nishizuka, 1994).

Isoformas	Localización Intracelular
α	Complejo de Golgi, dendritas y periferia del pericarion neuronal
β I	Periferia del pericarion neuronal
β II	Dendritas y complejo de Golgi
γ	Membrana plasmática, citoplasma (principalmente post-sináptico), núcleo.
ϵ	Axones, terminales nerviosos, complejo de Golgi

Tabla 3: Localización intracelular de las isoenzimas de PKC en neuronas (Tanaka y Nishizuka, 1994)

Distintas proteínas neuronales han sido descritas como sustrato de proteínas kinasas, entre estas: canales iónicos, receptores de neurotransmisores, proteínas del citoesqueleto, etc. Las fosfoproteínas pueden ser clasificadas en base a su función, residuos fosforilados (Ser, Thr, Tyr), especificidad de tejido, distribución celular y subcelular. Este último criterio es útil en células diferenciadas como en neuronas donde se pueden distinguir 4 grandes regiones: cuerpo neuronal, dendritas, axón y terminales nerviosas. En neuronas se han descrito 2 sustratos específicos de PKC: GAP-43/B-50, de localización presináptica, y la neurogranina/RC3, de localización postsináptica.

5.4. La fosfoproteína GAP-43/B-50

GAP-43 (Growth Associated Protein-43), también llamada B-50, neuromodulina y F1 (Liu y Storm, 1990; Gispen y col., 1991; Strittmatter y col., 1992) es un sustrato neuronal específico de PKC que se encuentra principalmente en axones, conos de crecimiento y terminales nerviosos presinápticos. A pesar de que GAP-43 ha sido descrita como una proteína específica de neuronas, se ha demostrado que bajo algunas circunstancias, la proteína es expresada por otros tipos celulares de SNC (Da Cunha y col., 1991; Deloulme y col., 1990). GAP-43/ B-50 es una proteína ácida (pI 4.3-4.7) de 226-247 aminoácidos, dependiendo de la especie. La proteína de rata, que según la secuencia de cDNA tendría un peso molecular de 23.6 KDa, tiene un peso molecular aparente de 43-48 KDa dependiendo del porcentaje de acrilamida del gel (SDS-PAGE) en el que se halla corrido (Schrama y col., 1987). La porción amino terminal (aminoácido 1 al 56) estaría involucrada en la asociación de la proteína a la membrana y contiene el sitio de fosforilación por PKC y de unión a CAM. La palmitoilación de las Cys-3 y/o Cys-4 es importante para su unión a la membrana y la Ser-41 es el aminoácido fosforilado por PKC (Aloyo y col., 1983; Baudier y col., 1989; Nielander y col., 1991; Spencer y col., 1992). Se ha observado que GAP-43 interactúa con CAM en una forma atípica, ya que a bajas concentraciones de Ca^{2+} , GAP-43 une CAM y libera CAM en presencia de Ca^{2+} (De Graan y col., 1990; Liu y Storm, 1990). Dado que el sitio de fosforilación por PKC se superpone al dominio de unión a CAM (aa 39-51), la fosforilación de GAP-43 es un factor modulador de la unión de CAM. La fosforilación de la GAP-43 inhibe la unión a calmodulina (Alexander y col., 1987; Chapman y col., 1991). Además se ha observado que los primeros 24 aminoácidos de GAP-43 están involucrados en la unión de GTP- γ -S a G_0 (Strittmatter y col., 1990). Además de ser sustrato de PKC ha sido observado que GAP-43 es sustrato de fosforilación de otras kinasas. *In vitro* la fosforilación de la proteína GAP-43/B-50 mediada por CKII puede ocurrir en 5 residuos: Ser-191/192 (principal fosfosito), Thr-88,89 y 95 (Apel y col., 1991). En cultivos neuronales y cerebro de rata recién nacida, la GAP-43/B-50 es también fosforilada por kinasas no identificadas, las cuales reconocen el

residuo Ser-96 y Thr-172 (Spencer y col., 1992). La forma fosforilada de GAP-43 puede ser defosforilada por proteínas fosfatasa PP1 y PP2A, presentes en la membrana plasmática presináptica y en secciones hipocampales (Docas y col., 1990; Pasinelli, 1996), e *in vitro* por Calcineurina purificada (Schrama y col., 1989; Seki y col., 1995).

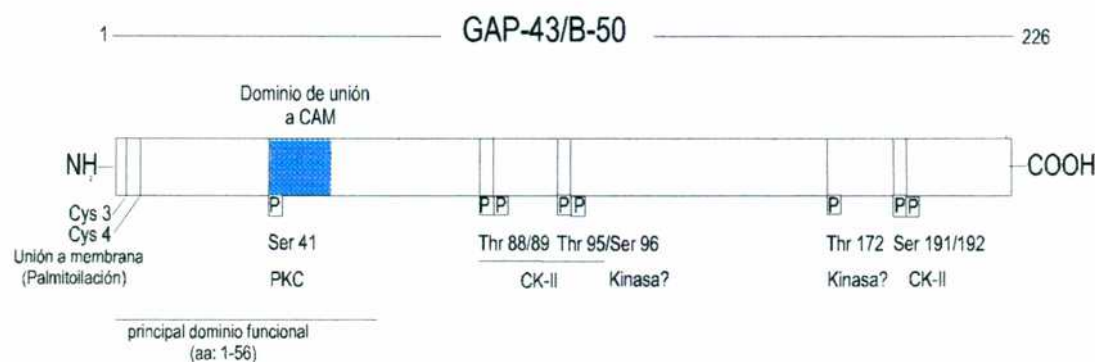


Fig 2: Representación esquemática de la proteína GAP-43/B-50 de rata. El esquema muestra la posición relativa del dominio de unión a calmodulina y del sitio de fosforilación específico para PKC (Ser-41). Además se indican los residuos de fosforilación para casina kinasa II (CKII) y para un sistema de kinasas desconocido (?). En la porción NH₂ se indican los residuos cisteína 3 y 4, los cuales participan del anclaje a membrana plasmática a través de la modificación postraducciona de palmitoilación.

La expresión de GAP-43 está restringida al sistema nervioso durante el proceso de diferenciación y crecimiento axonal, mientras que en el adulto, en neuronas no dañadas, la expresión es baja. En el hipocampo y en las áreas olfatorias del cerebro, las neuronas involucradas en la remodelación sináptica, expresan altos niveles de GAP-43 (Oestreicher y Gispén, 1986; Benowitz y col., 1988; Verhaagen y col., 1989). Se ha descrito que GAP-43 participa en diferentes formas de plasticidad en el cerebro y que la única kinasa capaz de fosforilar a GAP-43 que puede correlacionar con la regulación de estos procesos es PKC.

5.5. Participación de la proteína GAP-43/B-50 y de la PKC en los mecanismos plásticos del sistema nervioso:

La proteína GAP-43/B-50 está implicada en diferentes formas de plasticidad sináptica en el cerebro, tales como crecimiento y regeneración nerviosa, liberación de neurotransmisores, LTP y otras formas similares de plasticidad sináptica tales como sensibilización conductal por administración de AMPH y aprendizaje aversivo. En todos estos procesos los cambios en la fosforilación de la GAP-43 están mediados por PKC.

a) Liberación de neurotransmisor: Se ha observado que un aumento en la fosforilación de la proteína GAP-43 se correlaciona con un incremento en el proceso de neurotransmisión (Dekker, 1989). Por otra parte, ha sido demostrado que anticuerpos que inhiben específicamente la fosforilación de la GAP-43 dependiente de PKC, también inhiben la liberación de noradrenalina y Colicistoquinina (CCK) dependiente de calcio en sinaptosomas permeados con streptolisina-O (SL-O) (Dekker, 1989; Hens y col., 1993a; 1993b).

b) Crecimiento y regeneración: Durante el crecimiento axonal ha sido observado un incremento en la fosforilación de la GAP-43 mediado por la PKC en la proximidad del blanco neuronal (Dent y Meiri, 1992), representando posiblemente la estabilización del cono de crecimiento. Incrementos en la fosforilación de GAP-43 también correlacionan con una reducida extensión del crecimiento neurítico (Biewenga y col., 1996).

c) LTP: El modelo de plasticidad sináptica dependiente de actividad que ha sido más intensamente estudiado es la potenciación de largo plazo (LTP). Este es propuesto como un modelo para ciertas formas de memoria (Bliss y Collingridge, 1993). Se ha observado que la estimulación tetánica de secciones hipocámpales produce un aumento en la fosforilación de algunas proteínas, una de las cuales es la GAP-43 (Bar y col., 1980). Una correlación entre la fosforilación de GAP-43 y la inducción del LTP ha sido establecida a través de varios estudios (Benowitz y Routtenberg, 1987; Lovinger y col, 1986; Meberg y col., 1995). La activación de la PKC es uno de los pasos moleculares que ocurren durante el incremento y mantenimiento de la eficacia sináptica:

- manipulación farmacológica de la actividad de PKC altera el proceso de LTP.
- ratones que carecen de la isoforma γ PKC tienen alteraciones en el LTP.

- Mediciones de la actividad total de PKC usando sustratos exógenos o específicos de neurona han demostrado incrementos en su actividad, luego de estimulación tetánica.

- Durante el LTP también se detectaron translocaciones de isoenzimas de PKC desde el citosol a la fracción de membrana.

d) Finalmente se ha descrito que en estriado de rata, el tratamiento agudo con AMPH produjo una fosforilación reducida *post-hoc* de GAP-43 mediada por PKC (Gnegy y col., 1993). Sin embargo cambios significativos. No se detectaron cambios significativos en la actividad total de dicha kinasa.

CONSIDERACIONES FINALES Y OBJETIVO DE LA TESIS:

La participación de la PKC y de su sustrato presináptico GAP-43/B-50 fueron estudiadas en membranas sinápticas de estriado y corteza motora de rata en desarrollo, luego de una estimulación motora circular.

La actividad de la PKC puede ser determinada a través de su translocación a membrana (análisis de western blot), por medición de su actividad sobre sustratos o péptidos sintéticos agregados exogenamente, o bien determinando el grado de fosforilación de sus sustratos endógenos.

La primera y segunda aproximación metodológica sólo proveen una medida de la actividad total de la PKC, no discriminando entre PKC presináptica y postsináptica. Por lo tanto, para estudiar la actividad presináptica de la PKC, nosotros también medimos el estado de fosforilación de su sustrato neuronal específico GAP-43/B-50. Nosotros elegimos este sustrato por las siguientes razones:

1. La proteína GAP-43/B-50 es el sustrato de PKC mejor caracterizado en tejido neuronal, encontrándose además altamente expresado en las interneuronas colinérgicas del estriado.

2. Puede ser fosforilada (con diferente afinidad) por al menos tres isoenzimas de PKC.

3. La fosforilación de la proteína GAP-43/B-50 mediada por PKC está relacionada con la modulación de la liberación de neurotransmisores y es uno de los mecanismos moleculares activados durante las respuestas plásticas neuronales.

En el estriado de rata la fosforilación de la proteína GAP-43 participa en los procesos plásticos inducidos por la administración de AMPH. Esta es la única evidencia que demuestra la participación de la fosforilación de GAP-43 en mecanismos de plasticidad estriatal.

Estudios realizados por nuestro laboratorio demostraron que la actividad funcional producida durante un período crítico del desarrollo estriatal puede generar cambios plásticos permanentes en los niveles de neuroreceptores mACh y dopaminérgicos D1 y D2 (Ibarra y col., 1995, 1996; Ibarra 1997).

Por lo tanto el objetivo específico del presente trabajo fue determinar si la fosforilación de la proteína GAP-43/B-50, mediada por PKC, participa en la plasticidad, dependiente de la actividad motora, durante el desarrollo postnatal del estriado de rata.

MATERIALES Y METODOS:

1.MATERIALES

1.1.DROGAS Y REACTIVOS

El ligando radioactivo 3H-QNB fue obtenido de NEN Dupont a través de su representante en el país. El resto de las drogas, excepto que se describa otro origen en el texto, fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA), Carlo Erba (Italia) o Mallinckrodt Chemical Works (USA).

1.2. INSTRUMENTAL

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes equipamientos: centrífuga clínica TJG, microcentrífuga ECYS, espectrofotómetro UV/visible Jasco J 0063, cubetas de cuarzo Fisherbrand, cubetas descartables Kartell, contador de centelleo Tm Analytic 6891/Delta 300, homogeneizador de tejido Tissue-tearor modelo 985-370 Biospec Products Inc, cubas de electroforesis Vertical Slab Gel Unit modelo SE 200 Hoefer de Scientific Instruments, cuba de electroforesis Horizontal (Horizont 11-14 GIBCO-BRL-Life-Technology, INC), cuba de electrotransferencia (construida personalmente siguiendo el diseño de un equipo de Sigma) y fuente de poder BRL500 Life Technology. Todas las centrifugaciones de alta velocidad se realizaron en una centrífuga Sorvall RC5C provista de un rotor SS-34 y las ultracentrifugaciones en una centrífuga Beckman XL-90 con un rotor TI-90. El aparato de filtración para separar el ligando libre del unido en los ensayos de unión a ligando, fue construido personalmente siguiendo el diseño de un equipo de Millipore.

1.3. ANIMALES

1.3.1. Cepas utilizadas

El animal escogido como modelo experimental en el presente trabajo fue la rata de la cepa Sprague-Dawley. En todos los experimentos se utilizaron ratas machos. Estos fueron suministrados por el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME).

1.3.2. Mantenimiento de los animales

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

2. ENTRENAMIENTOS

Los animales fueron entrenados según 2 test diferentes: el Test de Entrenamiento Circular (TEC) y el Test de Plataforma Giratorio (TPG). Los animales, machos, fueron entrenados a distinta edad y con distintos esquemas de entrenamiento.

2.1. Test de Entrenamiento Circular (TEC)

2.1.1. Diseño y características del equipo

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

y la administración de la recompensa en forma automática (Brusés y Azcurra, 1993; Brusés y col, 1991).

El aparato empleado está conformado por una pista circular de 16 cm de ancho construida con dos cilindros de metal de 1.8 mm de espesor y 31 cm de alto a cada lado de la pista, figura 3. Los cilindros de 24 cm y 40 cm de diámetro, fueron colocados concéntricamente sobre una base de madera y el piso de la pista fue recubierto con goma antideslizante. Todo el material fue pintado de negro. La pista de entrenamiento fue iluminada con una luz blanca externa al aparato que incidía homogéneamente sobre toda la pista y recubierta con una tapa de acrílico de 2 mm de espesor con 4 orificios a 90° coincidiendo, cada uno, con la posición de cada par de emisor-detector infrarrojo (Fig 3).

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

libremente en ambos sentidos dentro del aparato, pero sólo recibirá la recompensa si realiza una vuelta completa en el sentido previamente asignado como correcto, ya que cada vez que el animal intercepte el 4° sensor el dispositivo de memoria es reseteado borrando el registro de sensores que puedan haber sido activado hasta el momento.

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

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

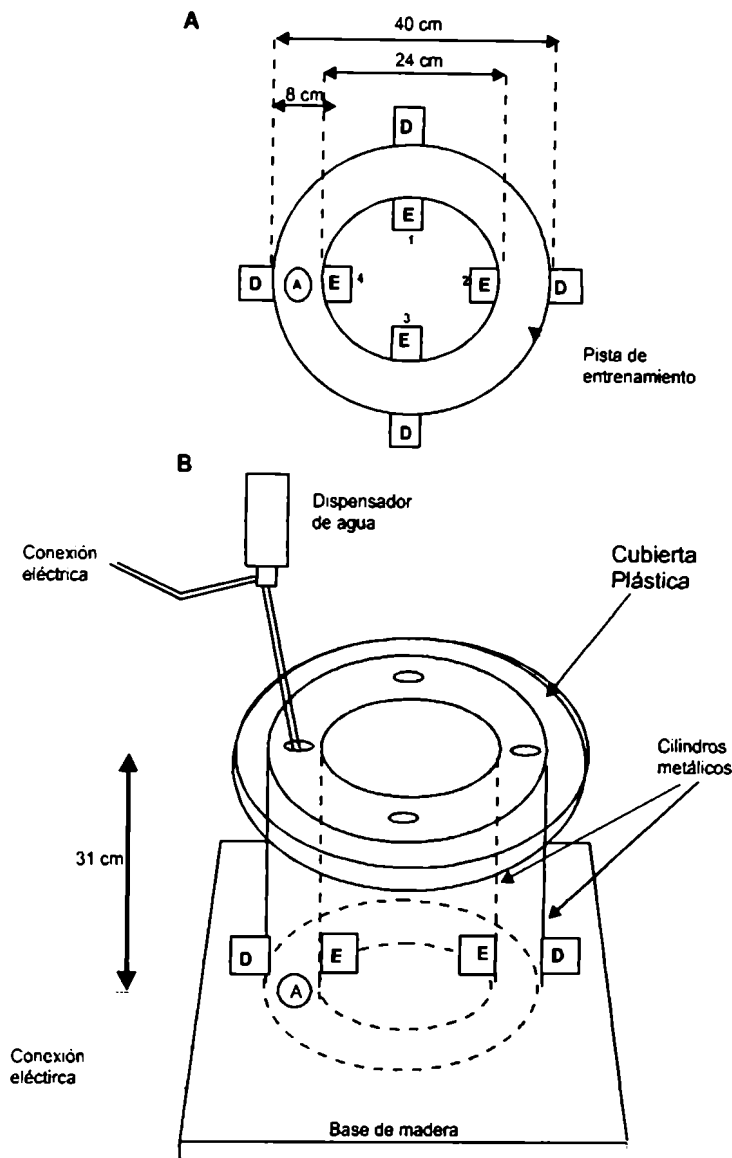


Fig 3: Diagrama esquemático del aparato del test de entrenamiento circular. (A) Vista superior de la pista de entrenamiento . Las dimensiones de la pista y las localizaciones de los emisores de luz infrarroja (E), detectores infrarrojos (D) y el lugar de recompensa (A) están indicados. (B) Vista frontal del aparato. el dispensador de líquido y los 4 detectores infrarrojos están conectados a un dispositivo eléctrico que controla el suministro de la recompensa y registra las vueltas realizadas en la dirección asignada

2.1.2. Procedimiento del entrenamiento

Ratas machos Sprague-Dawley de 20, 30, 40 y 60 días de edad fueron sometidas al test de entrenamiento circular, el cual fue realizado como nosotros describimos previamente (Brusés y Azcurra, 1993). Los animales fueron deprivados de agua 24 horas antes de comenzar el entrenamiento, y guiados a girar en una pista circular de un metro de largo en busca de una recompensa (50µl de una solución al 10% de agua azucarada por vuelta) durante 1, 2, 4 o 7 días (sin contar la sesión E₀ de aprendizaje). La primera sesión (E₀) consistió en recompensar a cada rata a través de sucesivas aproximaciones para que la misma complete una vuelta en un dado sentido (preestablecido azarosamente) durante 30 minutos: en los primeros 10 minutos las ratas fueron recompensadas cada cuarto de vuelta dado en la dirección correcta, durante los segundos 10 minutos fueron recompensadas cada media vuelta correcta, y los 10 minutos finales fueron recompensadas cada vez que completaron una vuelta en el sentido de giro preestablecido. De esta misma manera el entrenamiento fue repetido durante las siguientes sesiones diarias, de acuerdo a un esquema fijo de recompensas. Cada rata fue colocada diariamente en el tambor de entrenamiento para recorrer 150 metros (150 vueltas) en cada una de las sesiones. Si estas condiciones no fueron completadas dentro de los 30 minutos, la sesión fue terminada. La detección de las vueltas, el conteo del tiempo y el suministro de las recompensas fueron automáticamente ejecutados. El sentido horario o antihorario de giro fue asignado azarosamente en cada experimento. Animales controles no entrenados fueron también mantenidos diariamente en el aparato, pero no fueron entrenados. En todos los casos los pesos fueron registrados y aquellos animales con una disminución de más del 10 % en su peso fueron descartados. Además en todo momento los requerimientos locales para el trabajo con animales fueron cumplimentados.

2.1.3. Cuantificación del comportamiento en el TEC

En cada sesión se registraron los errores en la dirección de giro ó la velocidad con la cual el animal realizó la tarea.

2.1.4. Animales controles

Los animales usados como controles experimentales fueron sometidos al mismo esquema de privación hídrica. Cada animal control recibió una ración diaria de agua equivalente al promedio de ingesta hídrica de los animales entrenados en el lote experimental correspondiente. Sólo en algunos experimentos iniciales se trabajó simultáneamente con un segundo grupo control el cual no fue privado. Además de la privación hídrica, los animales controles fueron colocados en el aparato de entrenamiento pero no recibieron entrenamiento ni recompensa. El comportamiento del animal control fue registrado. El tiempo que cada animal control permaneció dentro del aparato en cada sesión de entrenamiento fue equivalente al promedio de permanencia de los animales entrenados en ese lote experimental en dicha sesión.

2.2. Test Plataforma Giratoria (TPG)

2.2.1. Diseño del equipo

El disco giratorio fue diseñado y construido de forma de mantener la mayor similitud posible con el aparato del TEC. Una plancha circular fue recubierta con goma antideslizante, colocada sobre una base de madera y rodeada de dos cilindros concéntricos, uno interno y otro externo. Todos los componentes guardaron las mismas dimensiones que los utilizados para el TEC. Esta estructura, finalmente fue colocada sobre un aparato tocadisco cuya velocidad de giro fue modificada de tal manera que

permitiera un movimiento de la estructura en el sentido horario o antihorario de 15 rpm. Una marca blanca fue hecha en una posición cualquiera, del lado interno y del lado externo del cilindro externo y fue utilizada como referencia durante el proceso de entrenamiento. El aparato también fue iluminado con luz blanca homogénea.

2.2.2. Procedimiento de entrenamiento

Ratas machos Sprague-Dawley de 30 días de edad fueron colocadas sobre una plataforma giratoria para conseguir que los animales desempeñen su actividad motora eliminando los procesos de aprendizaje asociativo espacial que posee el entrenamiento circular: TEC (comportamiento motor condicionado). Los animales fueron colocados en el tambor de entrenamiento, cuyo piso gira a una velocidad de 15 rpm, y las vueltas y el tiempo fueron contabilizados. En cada caso los animales recorren 150 vueltas (150 metros). El test de entrenamiento motor con plataforma giratoria fue ejecutado durante una única sesión. Los animales controles también fueron ubicados sobre la plataforma con el aparato desconectado. Estos realizaron un comportamiento exploratorio, no observándose en ningún caso un comportamiento motor comparable al de los animales entrenados.

3. OBTENCION DEL TEJIDO PARA ESTUDIOS NEUROQUIMICOS

3.1. Disección del cuerpo estriado y corteza motora.

En los tiempos indicados en cada diseño experimental, los animales fueron sacrificados rápidamente por decapitación con guillotina. Luego se realizó, en forma inmediata, un corte longitudinal de la piel en la línea media del cráneo y la misma fue removida dejando al descubierto la calota. Posteriormente se hizo un corte con alicate de la parte posterior del hueso occipital, se introdujo una espátula de punta roma entre la membrana aracnoide y la piamadre a fin de que entre aire en el espacio subaracnóideo y poder así introducir el

alicate sin dañar el cerebro. A continuación se realizaron dos cortes longitudinales de la calota a la altura de la comisura parieto-occipital del lado izquierdo y derecho, y la parte superior de la calota fue removida. Introduciendo una espátula en el sentido pósterio-anterior por delante de los lóbulos frontales, se seccionaron los tubérculos olfatorios y el cerebro fue levantado hacia atrás, retirado de la cavidad encefálica, colocado en un vaso de precipitado con solución fisiológica a 0 °C y enfriado a -20 °C durante 2 min.

A continuación, el cerebro fue puesto con la cara ventral hacia arriba sobre una cápsula de Petri cubierta con papel de filtro humedecido y ubicada sobre hielo. Se realizaron 3 cortes transversales con una hoja de afeitar o un bisturí, uno por delante de los tubérculos olfatorios, otro por detrás de los mismos. Luego, las distintas áreas a estudiar fueron disectadas con espátulas. Se disectaron ambos cuerpos estriados, izquierdo ó derecho, y la corteza motora (también respetando la lateralidad).

3.2.Fraccionamiento subcelular: Preparación de membranas plasmáticas de sinaptosomas (MPS):

Todos los experimentos fueron realizados entre 3 y 5 veces, usando pools de 4 a 6 animales para cada condición experimental. Las ratas fueron decapitadas a distintos tiempos después de finalizado el test de entrenamiento. Los cerebros fueron removidos rápidamente, y los estriados y cortezas motoras izquierdos y derechos fueron disectados, separados sobre hielo y pesados. Posteriormente los estriados izquierdos fueron pooleados entre sí, al igual que los estriados derechos, para estudiar posibles asimetrías neuroquímicas inducidas en el estriado por la estimulación motora circular producida en ambos tests. Lo mismo fue realizado con ambas cortezas motoras. Los tejidos fueron homogeneizados en 20 mM Tris-HCl pH 7.4 (solución 10% w/v), 0.32 M sacarosa, 1mM EDTA, 1 mM EGTA y 0.5 mM PMSF. La preparación de membrana plasmática de sinaptosoma fue obtenida de acuerdo a una modificación del método de Azcurra y De Robertis (1967). La homogeneización fue llevada a cabo a 1300 rpm mediante 40 golpes ascendentes y descendentes en un sistema de homogeneización de vidrio-teflón (Potter-Elvehjem), cuyo clearance fue de 0.25 mm. Luego de centrifugar el material a 1090 xg durante 10 min., los pellets fueron lavados dos veces y luego descartados. Los

sobrenadantes fueron centrifugados nuevamente a 13000 xg durante 20 min. (pellet mitocondrial).

Luego de dos lavados, los pellets fueron resuspendidos en buffer 2 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EGTA (shock osmótico) y centrifugados a 20200 xg durante 30 min. Luego los pellets fueron resuspendidos en buffer de homogeneización y cargados sobre un gradiente de sacarosa discontinuo (0.8-1 M) y centrifugados a 100000 xg máxima durante 80 min. a 4° C en un rotor Beckman 90 Ti. El material ubicado sobre la banda 1 M fue recolectado, lavado en el mismo buffer y pelleteado a 150000 xg 80 min. y finalmente resuspendido en buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 conteniendo 10 mM Mg Cl₂ y 1mM Ca Cl₂).

Todos los pasos de fraccionamiento subcelular fueron realizados en la presencia de 1 mM EGTA para evitar la defosforilación de la proteína GAP-43 (Meiri y Burdick, 1991; Gnegy y col, 1993).

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry (Lowry y col, 1951) usando seralbúmina bovina (Fracción V) como estándar.

4.PURIFICACION PARCIAL DE PKC A PARTIR DE CEREBRO BOVINO

4.1.Protocolo de purificación de PKC

Se efectuó según el método de Kitano et al (1986) modificado por Gómez et al (1988). 100-150 gramos de cerebro bovino se homogeneizaron con 3 volúmenes (p/v) de buffer de extracción (Tris-HCl, pH 7.4) 20 mM, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoetanol; 0.25 M sacarosa: buffer 1) en "Ultraturax". Después de centrifugar 1 hora a 10000 xg, el sobrenadante fue sembrado en una columna de DEAE-celulosa, previamente equilibrada con buffer 2 (Tris-HCl, pH 7.4 20 mM, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoetanol) . La columna fue lavada con 5 volúmenes de buffer 2 y 5 volúmenes de buffer 2 + 0.015 M de NaCl. Finalmente la muestra fue eluida con un gradiente ascendente continuo de NaCl (200 ml, de 0.015 a 0.31 M), en buffer 2. Fracciones de 4 ml fueron analizadas a 280 nm. Las fracciones que registraron una D.O. 280 nm superior a 0.6 fueron pooleadas (fracciones 15-25) y llevadas a 30% de

saturación con sulfato de amonio. Después de incubar durante 1 hora a 4°C con agitación, la muestra fue centrifugada a 12000 xg durante 20 min. El sobrenadante fue sembrado en una columna de fenil-sepharosa (vol: 20 ml), equilibrada con buffer 2 + 1.0 M (NH₄)₂SO₄. Luego de lavar la columna con 5 volúmen del mismo buffer, la muestra fue eluida con un gradiente continuo decreciente de (NH₄)₂SO₄ en buffer 2 (100 ml, 1 a 0 M). Para asegurar la elución completa de la PKC se mantuvo la columna durante 16 horas a 4°C en buffer 2 + 50 mM de (NH₄)₂SO₄. En cada fracción fue analizada la actividad de kinasa dependiente de calcio-fosfatidilserina y dioleína. Las fracciones en las cuales se registró actividad se utilizaron como fuente de enzima para los ensayos posteriores de fosforilación con PKC exógena.

4.2. Medición de la actividad de PKC bovina purificada

El ensayo de PKC se realizó midiendo la incorporación de ³²P (γ -³²P ATP) a la histona H-III S (Sigma), según una modificación del método de Takai et al (1977)

La mezcla específica de reacción contiene:

Tris-HCl, pH 7.4	20mM
MgCl ₂	10 mM
CaCl ₂	0.5 mM
fosfatidilserina	60 µg/ml (sonicada 1 min)
dioleína	3 µg/ml (sonicada 1 min)
Histona H-IIIS	400 µg/ml
[γ - ³² P]ATP	50 µM (Ae: 10 ⁴ cpm/pmol)

Para medir la actividad basal, en lugar de CaCl₂, fosfatidilserina y dioleína se utilizó 0.5 mM EGTA.

La medición se llevó a cabo mezclando 40 µl de la solución de la enzima con 20 µl de la mezcla de reacción e incubando dicha mezcla durante 10 min a 30°C . La reacción fue terminada pipeteando 40 µl de la mezcla sobre papel de fosfocelulosa (Whatman P-81) de 2 x 2 cm, que fueron inmediatamente sumergidos en una solución de ácido fosfórico 75 mM. Se llevaron a cabo 3 lavados de 20 min cada uno, luego los filtros fueron

secados a temperatura ambiente y la radioactividad incorporada fue registrada por centelleo líquido utilizando una mezcla centellante de tolueno-omnifluor.

La actividad enzimática fue determinada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{pmoles } ^{32}\text{P inc/min} = \frac{[\text{ATP}] \times \text{factor de dilución} \times \text{cpm registradas}}{\text{cpm totales de } [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} \times \text{tiempo}}$$

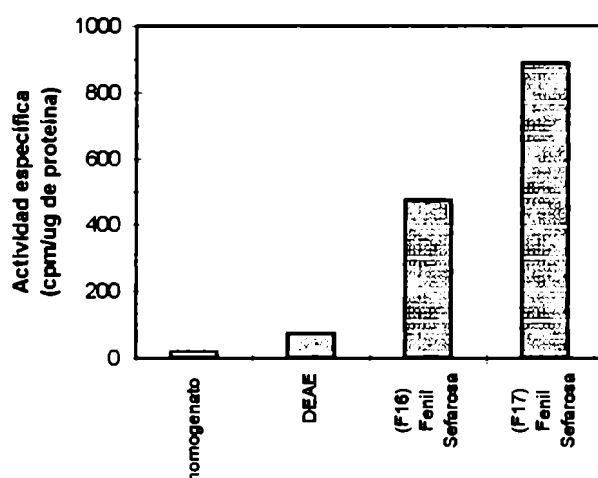


Figura 4: Diagrama de barras mostrando la actividad específica alcanzada en diferentes pasos del protocolo de purificación de PKC bovina. DEAE: representa el principal pico de actividad obtenido de la columna de intercambio aniónico. F16 y F17 (F: fracción) representan los principales picos de actividad obtenidos de la columna de Fenil Sefarosa. La actividad específica está expresada como: cpm incorporadas a histona μg de proteína.

5. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

10 a 50 μg de proteínas fueron sometidas a electroforesis unidimensional en geles de SDS-poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE). Los geles fueron teñidos con coomasie blue, desteñidos y expuestos a una película de autorradiografía (Agfa-Curix film). Finalmente el análisis densitométrico del film fue realizado usando un sistema de análisis de imagen (5.02 v Image Research Inc; Ontario-Canadá).

6. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE c-FOS

6.1. Tratamiento con metrazol

Ratas machos (adultos) fueron inyectadas intraperitonealmente con una dosis del agente convulsivante metrazol (Sigma 6, 7, 8, 9-tetrahydro-5-H-tetrazol 1,5-alazepina): 50 mg/kg de peso. Con el objeto de realizar un estudio cinético de la inducción del mRNA de c-fos por metrazol, las ratas fueron sacrificadas por decapitación a los 0, 30, 60, 90 y 210 minutos. Para la extracción de RNA se utilizaron 2-3 animales por cada tiempo.

6.2.Extracción de RNA

El RNA total de total de cuerpo estriado de rata fue preparado por el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Los estriados derechos e izquierdos fueron separados, cortados en pequeños fragmentos, lavados con PBS, y homogeneizados en buffer en presencia de isotiocianato de guanidina (4 M tiocianato de guanidina; 25 mM citrato de sodio; 0.1 M 2-mercaptoetanol; 0.5% lauril-sarcosina) con homogeneizador de cuchilla metálica a 15000 rpm durante 30 seg.

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

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

6.3.Análisis del RNA por Northern blot

El RNA total fue fraccionado por electroforesis en geles de agarosa 1 % en presencia de formaldehído y transferidos a membranas de Nylon (Hybond, Amersham). La

6.3. Análisis del RNA por Northern blot

El RNA total fue fraccionado por electroforesis en geles de agarosa 1 % en presencia de formaldehído y transferidos a membranas de Nylon (Hybond, Amersham). La cantidad e integridad del RNA fue confirmada, después de la transferencia por tinción de la membrana con azul de metileno. Después de fijar el RNA a las membranas durante 2 horas a 80 °C, estas fueron hibridizadas con una sonda marcada con [α - 32 P]dCTP por random priming (10^6 cpm/ml) en presencia de 50 % formamida a 42 °C. Las membranas fueron lavadas 2 veces, 15 min. cada lavado, con 2 X SSC, 0.1 % SDS a temperatura ambiente y 4 veces a 55 °C, 15 min. cada lavado, con 0.1 X SSC y 0.1 % SDS. Para detectar la expresión del proto-oncogen c-fos se utilizó un fragmento cDNA de c-fos de ratón (Fig. 5), escindido del plásmido pBFH480 por restricción con Hind III y Eco RI. La cuantificación de la expresión del mRNA de GAPDH (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa) fue realizada por densitometría. Esta medición permitió determinar que las diferencias observadas en la expresión del c-fos no fueron debidas a diferencias en la cantidad de RNA total sembrado en las distintas calles. El c-fos pudo ser cuantificado en un solo experimento debido a que los valores controles presentan niveles próximos al límite de detección de la técnica.

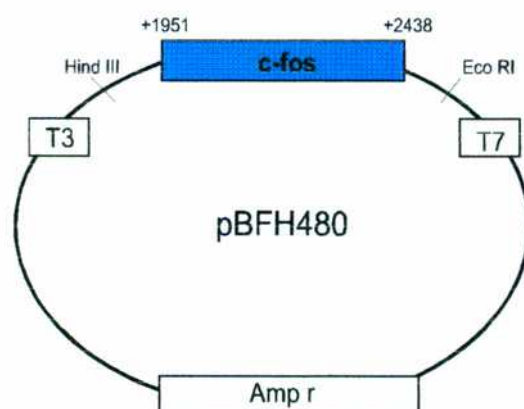


Figura 5: Fragmento de cDNA de c-fos que se extiende desde el nucleótido (+) 1951 al (+) 2438 clonado en el vector pBFH480.

Amp r: Gen que confiere resistencia a ampicilina

7. DETERMINACIONES NEUROQUIMICAS

7.1. Determinación de acetilcolinesterasa (AChE)

La determinación de AchE fue realizada por el método de Ellman (4). Para ello, 40 μ l de muestra fueron incubados durante 20 minutos con 985 μ l de buffer fosfato 0.1 M pH 8, 35 μ l de 0.1 M DTNB, 40 μ l de 10^{-5} M ethopropazina (inhibidor de la butirilcolinesterasa). A continuación se agregaron 40 μ l de 15 mM acetiltiocolina y, manteniendo la temperatura a 37°C, se realizó la lectura espectrofotométrica continua a 412 nm durante 3 minutos. La actividad enzimática fue determinada por la degradación de la acetiltiocolina, con exposición del grupo tiol que al reaccionar con el DTNB produce un complejo de coloración amarilla.

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

Actividad de AchE/mg proteína en fracción X

Actividad de AchE/mg proteína en Homogenato

Fracción subcelular	Homogenato/ Pellet total	Núcleo	Mitocondria	Microsoma	MPS-1M
Actividad específica de AChE	1.0	1,12 \pm 0,23	0,95 \pm 0,13	1,79 \pm 0,44	4,3 \pm 0,91

Tabla 4: *Distribución de la actividad acetilcolinesterasa en fracciones subcelulares. los valores representan la actividad específica relativa de la enzima evaluada como se describe en Materiales y Métodos.*

La tabla 4 muestra los niveles detectados de AChE en distintas fracciones subcelulares en cuerpo estriado ratas. Esta enzima es una proteína de membrana sináptica que participa en la transmisión colinérgica y puede ser utilizada como marcador de fracción de membrana sináptica. La distribución de la actividad específica de AChE permite determinar el grado de enriquecimiento en terminales sinápticos colinérgicos de cada

fracción. De la tabla se desprende que la fracción MPS-1M del gradiente de sacarosa presenta la mayor concentración de actividad de esta enzima marcadora.

7.2. Evaluación del Receptor Colinérgico Muscarínico (mAChR)

La cuantificación del receptor colinérgico muscarínico se realizó mediante la técnica de ensayos de unión (binding) competitivos empleando como ligando específico el ^3H -QNB, con una actividad específica de 30-60 Ci/mmol.

La determinación de receptores mACh fue realizada por ensayos de subsaturación (0,9 nM de ^3H -QNB) y saturación (1,8-2 nM ^3H -QNB) sobre las distintas muestras de tejido obtenidas a partir de la fracción de MP 1M del gradiente de sacarosa. Para ello, el tejido (10-20 μg de proteína membrana sináptica 1M) fue incubado en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, volumen final de incubación 0.5 a 1.0 ml, en presencia de 0,9 o 2 nM ^3H -QNB durante 30 min a 37 °C bajo agitación. Cada determinación fue realizada por triplicado y la unión inespecífica del ligando al tejido fue evaluada en presencia de 10 μM de Atropina por ensayo duplicado.

El ensayo de unión al ligando específico se realizó mediante la técnica de Yamamura y Snyder (1974). Luego de la incubación, el ligando unido se separó del ligando libre por el método de filtración al vacío utilizando un aparato de filtración de 8 bocas tipo Millipore y usando filtros de papel Whatman GF/B, con una velocidad de flujo de 5 ml/min. La incubación se cortó con el agregado de 3 ml de buffer de incubación frío al tubo de ensayo, este se volcó sobre el filtro correspondiente y se lavó 3 veces con 4 ml del mismo buffer. Los filtros se colocaron en un vial y se secaron en estufa a 42 °C durante toda la noche. Los viales se cargados con 10 ml de líquido de centelleo (0.25 g POPOP y 4 g PPO por cada litro de tolueno bidestilado), fueron mantenidos a 20 °C en oscuridad durante 30 min antes de realizarse la cuantificación de radioactividad.

En todos los casos, luego de la eliminación del ligando libre, la radioactividad remanente fue cuantificada en un contador de centelleo. Para determinar el quenching y la eficiencia del aparato se utilizó el método de relación de canales y una curva estándar para tritio.

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

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

Las DPM obtenidas a partir de un tubo incubado en presencia del desplazante particular (por ejemplo, atropina 10 μM) para el $^3\text{H-QNB}$ corresponden a la unión inespecífica del ligando al tejido. Incubando en ausencia del desplazante frío se obtienen las DPM totales. Las DPM correspondientes a la unión del ligando al receptor es:

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

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

7.3. Ensayos de fosforilación de GAP-43

La fosforilación endógena fue realizada usando condiciones que se saben activan PKC endógena (Kristjansson et al 1982). 10 a 50 μg de proteína de MPS fueron preincubadas 5 min. a 30 $^{\circ}\text{C}$ en un volúmen final de 25 μl en la presencia de 7.5 μM ATP y 2 μCi [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP (Dupont 6000 Ci/mM en buffer A). La reacción fue iniciada por el agregado de ATP y finalizada 1 min después mediante el agregado de 12.5 μl de una solución desnaturizante 3X conteniendo SDS (187.5 mM Tris-ClH pH 6.5, 6% SDS, 15% β -mercaptoetanol, 30 % glicerol y 0.003 % azul de bromofenol).

En algunos experimentos PKC exógena, purificada de acuerdo al protocolo descrito anteriormente, fue agregada al medio de incubación de MPS inactivadas por calentamiento (100 $^{\circ}\text{C}$, 2 min). Las reacciones de fosforilación fueron llevadas a cabo

durante 1 y 10 min respectivamente con 10 μ l de PKC exógena por cada 10 μ g de proteínas de MPS (2 pmoles/min \cdot μ l).

7.4. Determinación de la actividad de PKC

La actividad de la PKC fue determinada mediante un ensayo de fosforilación in vitro usando histona III S (Sigma) como sustrato (Cole. y col, 1988). Las reacciones fueron realizadas a 30 °C durante 1 min, en un volúmen final de reacción de 25 μ l usando 8 a 10 μ g de proteínas de MPS. La mezcla de reacción contiene 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.2 mM EDTA; 10 mM MgCl₂; 5 mM β -mercaptoetanol; 10 μ M ATP; 100 μ g/ml inhibidor de PKA (Sigma); 0.6 μ g/ μ l de histona III S y 1 μ Ci de [γ -³²P] ATP. La incorporación de fosfatos fue evaluada en la presencia o ausencia de los activadores de PKC: 0.1 μ M 4 β -forbol 12-mirystate 13-acetate (TPA), 100 μ g/ml de fosfatidil serina (Sigma) y 1 mM de CaCl₂. La reacción fue finalizada mediante el agregado de 12.5 μ l de una solución de desnaturalización 3X conteniendo SDS. Las fosfoproteínas marcadas fueron separadas en un gel SDS-PAGE 15%. Luego de la fijación y tinción con coomasie los geles fueron secados y expuestos a una película de autorradiografía Agfa-Curix film. La banda de la histona fue escindida del gel seco y la radioactividad fue medida en un contador β por centelleo líquido. La actividad de PKC fue calculada como pmoles de ³²P incorporados/min \cdot mg de proteína. Cada ensayo fue realizado por cuadruplicado.

7.5. Western blot de GAP-43

20 a 40 μ g de proteínas de SPM fueron transferidas electroforéticamente (Towbin y col, 1979) durante 12 horas a 250 mA en buffer de Towbin a membranas de nitrocelulosa, poro 0.45 μ m. Con el objeto de identificar, en forma semicuantitativa, la presencia de GAP-43 en MPS se utilizaron IgGs anti-B-50 (8920), purificadas en columnas de afinidad (Oestreicher et al., 1983; Mercken et al., 1992). Después de preincubar las membranas en TBS (10⁵ mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5), 22 °C en presencia de 5% leche descremada (Molico) durante 60 min a 22 C con agitación, fueron

incubadas con el antisuero específico diluído 1/1000 durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. La inmunoreactividad fue detectada usando anticuerpo secundario biotinilado y complejo avidina-biotina conjugado a peroxidasa (Vectastain Elite ABC kit, Vector) y visualizado con diaminobenzidina en presencia de H_2O_2

7.6. Inmunoprecipitación de GAP-43

El ensayo de inmunoprecipitación fue desarrollado según el método de Oestreicher y col (1986). 25 μ g de proteína fosforilada desnaturalizada de MPS fueron ajustadas a una concentración de 2 μ g de proteínas cada 20 μ l con buffer de inmunoprecipitación (Buffer C: 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na_2HPO_4 y 0.5 % Nonidet P-40). Posteriormente 100 μ l de antisuero anti-B-50 diluído 1/50 en buffer C fueron agregados. Los anticuerpos fueron incubados durante 16 horas a 4 °C con agitación. Con el objeto de precipitar los complejos antígeno-anticuerpo formados, proteína A de membranas de *Staphylococcus Aureus* (SAC), inactivadas con formaldeído, fueron utilizadas. Después de lavar las membranas 2 veces con buffer C, 50 μ l de esta preparación fueron agregados a la mezcla de inmunoprecipitación e incubados durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de centrifugar durante 10 min a 4800 xg en una microcentrífuga de mesada refrigerada (Eppendorf), los pellets fueron resuspendidos en 30 μ l de solución desnaturalizante de SDS y hervidos durante 10 min. La incorporación de fosfatos radioactivos a la GAP-43 inmunoprecipitada fue analizada mediante electroforesis en geles desnaturalizantes 12 % (SDS-PAGE), seguido por autorradiografía y densitometría del mismo.

8. Análisis estadístico

Un análisis de la varianza de 2 factores o de 1 factor (ANOVA) fueron usados según los casos para analizar los resultados neuroquímicos. El diseño de la ANOVA de 2 factores consideró control vs. entrenado, como un primer factor, y hemisferio ipsi vs. contralateral (o izquierdo vs. derecho), como un segundo factor. Las diferencias entre

grupos fueron medidas aplicando el test *t* de Student para muestras pareadas o no pareadas; o mediante la utilización de tests de comparaciones múltiples (Student-Newman-Keuls o Dunnett) para muestras no pareadas.

Los coeficientes de correlación fueron obtenidos estudiando el grado de asociación lineal entre dos variables, usando el programa Graph-Pad InStat Software Inc.

RESULTADOS

1. Evaluación del comportamiento de los animales en el TEC

La prueba conductal en el TEC representa el modo de inducción de una respuesta fisiológica en los animales, la cual a su vez genera modificaciones neuroquímicas en las áreas cerebrales involucradas. Cualquier análisis de los cambios neuroquímicos desencadenados por la actividad funcional deberá evaluar si el comportamiento desarrollado en el test fue similar o no entre los distintos grupos experimentales. En particular en este test de comportamiento condicionado la actividad final desarrollada por los animales está fuertemente influenciada por la destreza motora y la habilidad para aprender la consigna (Brusés y Azcurra, 1993). Durante el TEC el comportamiento motor fue evaluado a través de la variable velocidad de giro, dado que la misma se relaciona con la respuesta particular del animal en forma independiente del operador. Por otra parte se seleccionó la variable errores asociativos (EA) para evaluar de la manera más precisa posible el componente de aprendizaje asociativo. Los EA fueron medidos durante los primeros 5 minutos de la segunda sesión de entrenamiento para dejar fija la variable tiempo. En estos primeros minutos de cada sesión los animales cometen 75-80 % de los errores totales registrados en esa sesión. La discriminación espacial evaluada en el TEC muestra similitudes con respecto a la discriminación espacial observada en un laberinto en T.

1.1. Comparación de la respuesta al TEC entre animales de distinta edad.

La respuesta motora (velocidad) y el aprendizaje asociativo (EA) fueron evaluados en animales machos de 20, 30, 40 y 60 días de edad al cabo de la segunda sesión de entrenamiento (E2D). Los valores de estas variables fueron volcados en la tabla 5.

EDAD (Días)	Velocidad (metros/min) \pm SD	Errores Asociativos (EA) \pm SD
20	5,34 \pm 0,93	11,3 \pm 2,38 *
30	5,50 \pm 0,82	5,40 \pm 1,87
40	6,01 \pm 0,63	4,33 \pm 1,36
60	5,06 \pm 0,91	3,83 \pm 1,87

Tabla 5: Análisis comparativo de los errores asociativos y la velocidad desarrollada en función de la edad. Los valores corresponden a la segunda sesión de entrenamiento circular. Los errores asociativos corresponden a los valores registrados en los primeros 5 minutos de la sesión (E2D). * $P < 0,001$ vs otras edades, por el test *t* de Student-Newman-Keuls para muestras no pareadas.

El estudio de la velocidad demuestra que desde el punto de vista de esta variable no existen diferencias en el comportamiento motor entre ninguna de las edades testeadas ($P > 0,1$). Sin embargo, desde el punto de vista de los errores asociativos el grupo de animales de 20 días mostró la mayor cantidad de errores. El análisis estadístico indicó la presencia de diferencias significativas respecto a los otros 3 grupos de edades ($P < 0,001$). Entre los animales de 30, 40 y 60 días de edad no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,1$).

En el caso particular de las ratas de 20 días de edad, si bien éstas no mostraron diferencias significativas relacionadas con la velocidad, a esta edad se detectó una mayor cantidad de errores asociativos. Posiblemente una mayor respuesta motora pudo ser desplegada por los animales de 20 días, la cual le permitió obtener una velocidad de giro (recompensada) similar a la de los otros grupos. Por lo tanto, si bien la velocidad registrada en el TEC no representaría la velocidad real, ésta puede ser una buena aproximación para estudiar la correlación con los cambios bioquímicos a una edad particular. Queda claro también que la velocidad registrada es mayor o igual que la real. Las velocidades registradas durante el TEC y volcadas en la tabla 5 superan en todos los casos la velocidad de 5 metros por minuto. Esta intensidad de actividad motora produce en el estriado contralateral cambios bioquímicos detectables, los cuales están relacionados entre otros con el metabolismo dopaminérgico (Freed y Yamamoto, 1995).

Es interesante mencionar que el análisis comparativo de las velocidades registradas en el TEC durante 7 sesiones diarias consecutivas entre las distintas edades demuestra que las ratas de 20 días poseen una mayor velocidad teórica máxima (V_m) ($P < 0,001$) y necesitan una mayor cantidad de refuerzos para alcanzar la mitad de su máxima velocidad teórica (L) ($P < 0,001$). Estas variables son obtenidas luego de aplicar una transformación (similar a la de Scatchard) a los valores de velocidad y número de vueltas totales (Brusés y Azcurra, 1993; Heyman y Beer, 1987). No existieron diferencias significativas luego de comparar entre sí a las mismas variables en ratas de otras edades ($P > 0,1$) (Tabla 6).

EDAD	V_m	L
20	16,928± 2,41 *	415±46 *
30	12,24± 2,03	175±32
40	11,955± 1,45	205±38
60	11,78±1,83	198±27

Tabla 6: *Análisis de los valores de V_m y L en función de la edad, luego de 7 sesiones de entrenamiento circular. * $P < 0,001$ vs. otras edades, por el test de Student-Newman-Keuls para muestras no pareadas.*

Por último la tabla 7 muestra la evolución de las mismas variables (EA y velocidad) en función de las sesiones de entrenamiento para los animales de 30 días de edad. Esta tabla muestra que entre la primera y la segunda sesión se produce una reducción significativa (51,3 %) en el número de errores asociativos ($P < 0,001$). Con respecto a la velocidad la misma alcanza una estabilización entre las sesiones 3 y 4.

Sesión de entrenamiento N°	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
EA	11,1± 3,7	5,4± 2,6 *	4,8± 2,3	4,02±1,62	4,14±0,93	2,58± 0,8	1,83± 0,56
Veloc. (m/min)	3,5 ± 0,3	5,5 ± 0,82	7,02±1,07	8,23±1,2	8,61±1,4	9,16±1,62	8,73± 1,85
edad (días)	31	32	33	34	35	36	37

Tabla 7: *Evolución de la velocidad y los errores asociativos en animales de 30 días durante las sesiones de entrenamiento. *P<0,001 vs E1 por test t de Student para muestras pareadas.*

2. Identificación de la fosfoproteína GAP-43/B-50 y detección de su fosforilación por PKC en preparaciones de membranas plasmáticas sinaptosomales (MPS) de estriado de rata

Durante el presente trabajo se estudió la fosforilación de la proteína GAP-43/B-50 utilizando técnicas que requieren electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). La banda correspondiente a la proteína GAP-43 fue identificada mediante la utilización de anticuerpos policlonales (generosamente cedidos por la Dra. A. B. Oestreicher, RMI, Utrecht University, The Netherlands). En la figura 6, la banda indicada como GAP-43 presentó inmunoreactividad por ensayos de western blot. Además esta fosfoproteína fue bajo condiciones que activan PKC endógena (Fig. 6), así como también por PKC exógena purificada (Fig. 13). Como se observa en la figura 6, la utilización del éster de forbol TPA incrementó significativamente su nivel de fosforilación ($P<0,01$). Contrariamente el quelante de Ca^{++} (EGTA) y los inhibidores de PKC (H7 y Staurosporina) redujeron significativamente la incorporación de fosfatos radioactivos dentro de la proteína GAP-43 ($P<0,01$). Esta misma banda fue específicamente inmunoprecipitada luego de llevar a cabo ensayos de fosforilación in vitro utilizando condiciones que activan PKC endógena (Fig. 10).

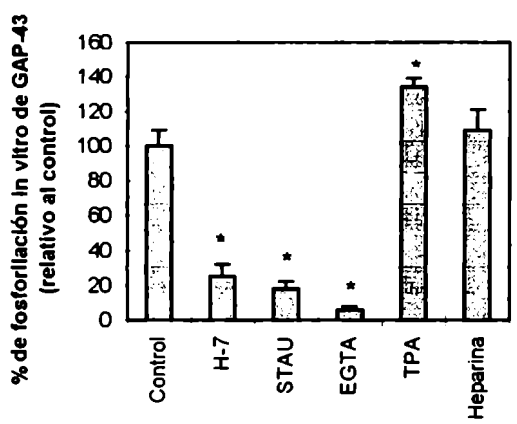
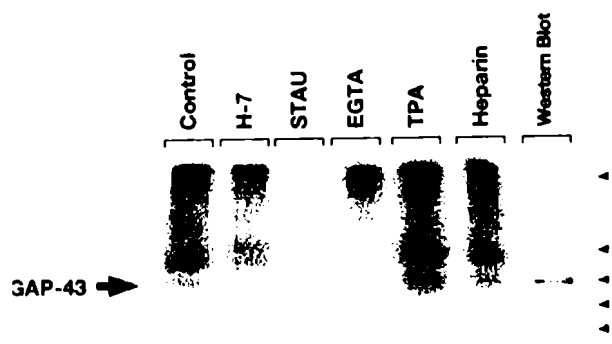


Figura 6: Identificación de GAP-43. *Panel superior:* Autorradiografía representativa de un ensayo de fosforilación endógena de proteínas de MPS aisladas a partir de cuerpo estriado. Las reacciones fueron realizadas en ausencia (control) o en presencia de diferentes agentes: H-7 (10^{-4} M), Staurosporina (10^{-5} M), EGTA (2,5 mM), Ester de forbol (TPA, 1 μ M) y heparina 5 μ g/ml (inhibidor de caseína quinasa). La última calle muestra un inmunoblot representativo de la proteína GAP-43/B-50. La cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95,5; 55; 43; 36; 29; 18; 5; 12. **Panel inferior:** Cuantificación del nivel de fosforilación in vitro de GAP-43 B-50. Los datos están expresados como porcentaje del valor control y representan la

*media ± SD de 3 experimentos independientes medidas por triplicado *P: 0,01 por el test de Dunnett.*

La proteína de rata presenta un peso molecular aparente de 43-48 KDa dependiendo del porcentaje de poliacrilamida del gel (Schrama y col., 1987). En todos los casos la proteína indicada como GAP-43 presentó una movilidad electroforética de 43 KDa y fue una de las principales fosfobandas observadas en los autorradiogramas. En sistema nervioso la proteína GAP-43 ha sido descrita como uno de los principales sustratos de PKC (Aloyo y col., 1983). Sin embargo la GAP-43 puede ser fosforilada *in vitro* por otra/s kinasa/s que aún no han sido identificadas (Spencer y col., 1992). En este último trabajo se demuestra que la fosforilación de la proteína GAP-43 está limitada al residuo Ser-41, sitio específico para PKC, en cultivos de ganglio cervical superior tratados con el detergente saponina. Estos resultados sugieren que este sistema de kinasa/s podría ser sensible a saponina o soluble bajo estas condiciones. Por lo tanto nosotros llevamos a cabo la fosforilación *in vitro* de proteínas de MPS en ausencia y presencia de este detergente. Como se observa en la figura 7 el tratamiento con saponina no modificó el nivel de fosforilación de GAP-43, por lo que este sistema alternativo de fosforilación de kinasa/s no participaría en nuestras preparaciones de membranas sinápticas estriatales.

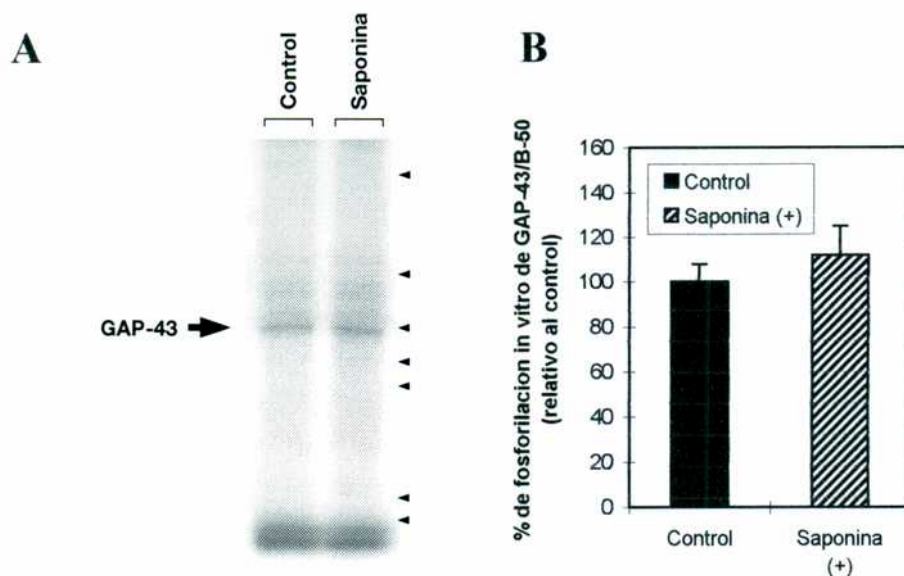


Figura 7 :**A-** Autorradiografía representativa mostrando la fosforilación in vitro de proteínas de MPS aisladas a partir de estriado total de rata. Las muestras fueron fosforiladas en ausencia (control) o presencia (+) del detergente saponina 0,02% p/v. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95.5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12 kDa. **B-** Cuantificación de la fosforilación endógena de GAP-43/B-50. Los datos se expresan como % del valor control y representan la media \pm SD de tres experimentos independientes medidas por duplicado.

Además, la GAP-43 puede ser fosforilada in vitro por CKII (Pisano y col., 1988), principalmente sobre residuos Ser-192/193 (Apel y col., 1991). Para descartar la posible participación de esta kinasa, nosotros realizamos ensayos de fosforilación endógena en presencia de heparina, un potente inhibidor de CKII (Apel y col., 1991). Como se observa en la figura 6, el análisis densitométrico demuestra que la incorporación de fosfatos radioactivos no está afectada por el tratamiento con heparina. Estos resultados sugieren que la GAP-43/B-50 está siendo fosforilada por PKC en fracciones de MP de sinaptosomas aisladas a partir de cuerpo estriado de rata.

3. Estudio de la fosforilación endógena de la proteína GAP-43/B-50 en cuerpo estriado de rata de 30 días de edad luego de distintas sesiones de entrenamiento circular (TEC).

Una vez identificada la fosfobanda correspondiente a la proteína GAP-43, nosotros utilizamos preparaciones de membranas sinápticas para determinar si la fosforilación *in vitro* de esta proteína es modificada luego de realizar diferente número de sesiones de entrenamiento circular. Comenzamos utilizando membranas sinápticas de estriado de rata de 30 días de edad que fueron sacrificadas 30 minutos después de finalizada la respectiva sesión de entrenamiento, ya que datos previos de nuestro laboratorio indicaban que en estas fracciones pueden ser detectados cambios significativos en la afinidad del receptor muscarínico de acetilcolina (Ibarra, 1997). Además amplias evidencias indican que en los procesos plásticos en los que participa la PKC, ésta interviene casi exclusivamente entre los 5 y 60 minutos post estimulación (Akers y col, 1986; Ramakers y col, 1995; Pasinelli, 1996).

La figura 8 muestra que solamente cuando los animales fueron entrenados durante dos sesiones consecutivas (una cada día) se observó una reducción significativa en la fosforilación endógena de la GAP-43 en el estriado contralateral al sentido de giro. Por el contrario, cuando los animales fueron entrenados durante 1, 4, o 7 sesiones consecutivas, no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control no entrenado. Estos resultados indican que luego de la segunda sesión de entrenamiento circular los cambios en la fosforilación *in vitro* de la GAP-43 pueden ser generados por la actividad fisiológica y que los mismos se disparan mayoritariamente cuando los animales alcanzan un determinado nivel de actividad durante el entrenamiento. Por lo tanto los estudios posteriores utilizando el TEC fueron realizados hasta la segunda sesión de entrenamiento.

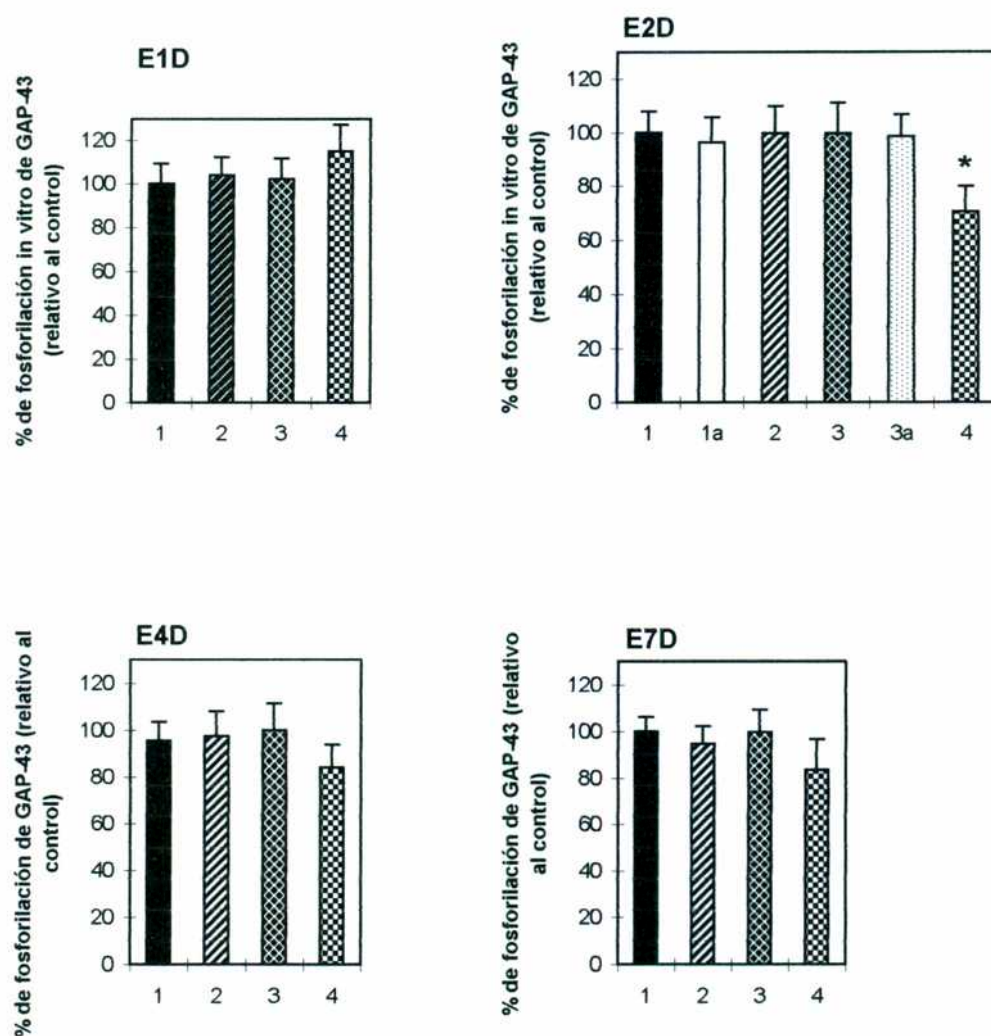


Figura 8: *Análisis del nivel de fosforilación de GAP-43 en función de las sesiones de entrenamiento. Cuantificación densitométrica de las autorradiografías correspondientes a la fosforilación endógena de la proteína GAP-43 luego de 1,2,4 y 7 sesiones diarias de entrenamiento circular. En todos los casos los animales de 30 días fueron sacrificados 30 minutos post entrenamiento y los estriados izquierdo y derecho fueron procesados separadamente. En cada sesión los valores se expresan como el porcentaje del máximo valor control y representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Cada determinación fue realizada por triplicado o cuadruplicado. 1- Control ipsilateral (deprivado de agua), 1a-control ipsilateral no deprivado, 2- entrenado ipsilateral, 3- control contralateral (deprivado de agua), 3a- control contralateral no deprivado, 4- entrenado contralateral. * $P < 0,001$ vs. controles contralaterales por el test de Student-Newman-Keuls*

después de ANOVA y vs. entrenado ipsilateral por test t de Student para muestras pareadas.

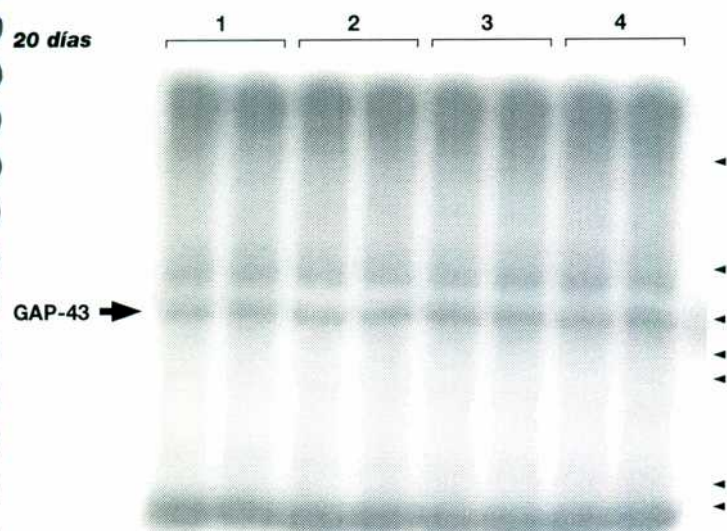
4. El entrenamiento circular modifica el estado de fosforilación de la proteína GAP-43/B-50 en el cuerpo estriado de rata durante el desarrollo postnatal

Los efectos del test de entrenamiento circular (TEC) sobre la fosforilación *in vitro* de la GAP-43/B-50 fueron evaluados durante el desarrollo postnatal del estriado de rata. Para realizar estos experimentos, ratas machos de 20, 30, 40 y 60 días de edad fueron sometidas al test de entrenamiento circular (durante 2 sesiones de entrenamiento, E2D) y sacrificadas a los 30 minutos después de finalizada la tarea. En todos los casos se aislaron MPS a partir de cuerpo estriado discriminando entre hemisferios ipsi y contralateral al sentido de giro. Como puede ser observado en la figura 9 las membranas provenientes de animales de 30 días de edad muestran una reducción en la fosforilación *in vitro* de la proteína GAP-43/B-50. Los animales entrenados mostraron una disminución promedio del 29,5 % en el nivel de fosforilación endógena en el estriado contralateral respecto del lado ipsilateral ($P < 0,001$). Cuando comparamos los niveles de fosforilación de GAP-43 entre los estriados izquierdo vs. derecho (o ipsi vs. contralateral) de animales controles, no detectamos diferencias significativas en ningún caso.

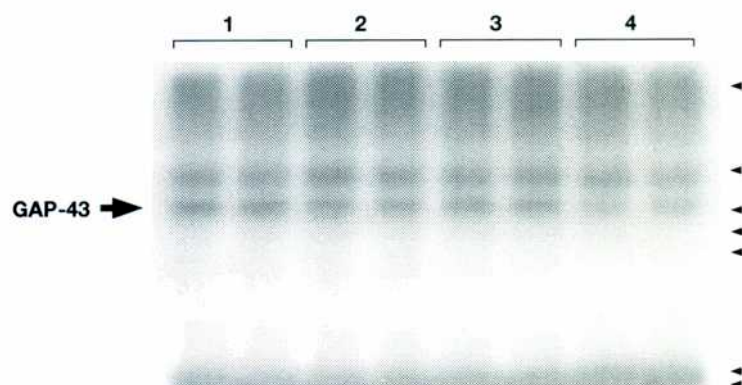
Además, el TEC produjo una caída significativa del 29,3 % en la fosforilación endógena de GAP-43 respecto al estriado de animales controles ($P < 0,001$). Estos cambios ocurrieron en el estriado contralateral, independientemente de la dirección de giro elegida en cada experimento.

Animales de 20, 40 y 60 días de edad no mostraron diferencias significativas en relación al nivel de fosforilación de esta proteína (Fig.9) ($P > 0,1$).

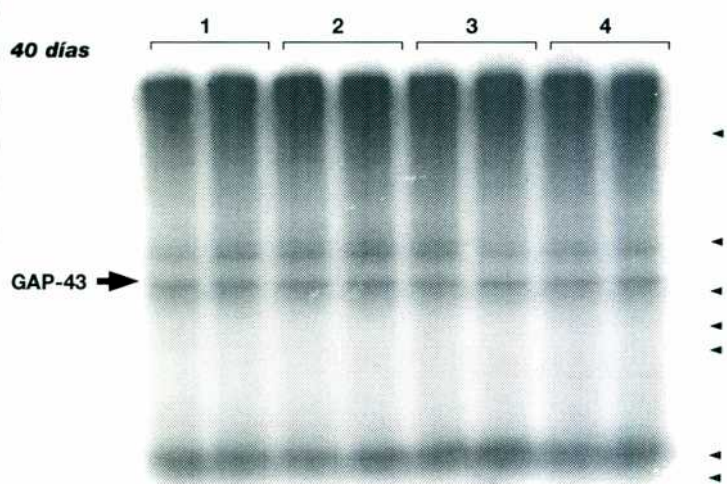
20 días



30 días



40 días



60 días

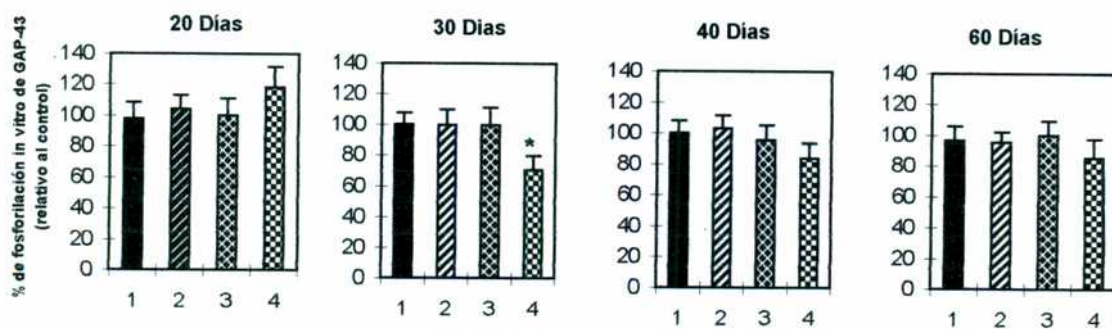
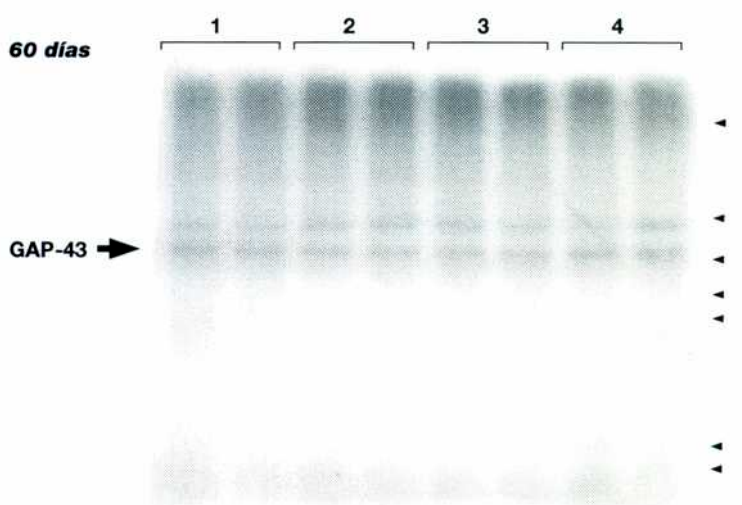


Figura 9: Análisis del nivel de fosforilación de GAP-43 durante el desarrollo postnatal. Panel superior: Autorradiografías representativas mostrando la fosforilación endógena de proteínas de MPS aisladas a partir de estriado izquierdo y derecho de ratas controles y entrenadas durante 2 días (E2D). Animales de 20, 30, 40 y 60 días de edad fueron entrenados y sacrificados 30 minutos después de finalizado el TEC. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95,5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12 kDa. **Panel inferior:** Cuantificación densitométrica del nivel de fosforilación endógena de GAP-43 a partir de las autorradiografías del panel superior. Para cada edad los valores fueron expresados como el porcentaje del máximo valor control y representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes. Cada determinación fue realizada por cuadruplicado. 1- Control ipsilateral, 2- Entrenado ipsilateral, 3- Control contralateral, 4- Entrenado contralateral. * $P < 0,001$ vs control contralateral por el test *t* de Student para muestras no pareadas y vs. entrenado ipsilateral por el test *t* de Student para muestras pareadas.

Si bien en preparaciones de MPS el grado de fosforilación de GAP-43 puede ser directamente cuantificado, sin necesidad de inmunoprecipitación (Zwiers, 1976; Eichberg, 1986), se decidió verificar los resultados obtenidos mediante inmunoprecipitación específica de GAP-43. El análisis densitométrico de los ensayos de inmunoprecipitación también reveló una disminución significativa en la fosforilación *in vitro* de GAP-43 en el estriado contralateral al sentido de giro (Fig 10). la magnitud de esta caída fue del 28 % ($P=0,05$) respecto al estriado ipsilateral entrenado y del 28,5 % ($P<0,05$) respecto del estriado control contralateral. esto confirma, no solo la identidad sino también el nivel de variación en la fosforilación endógena de la GAP-43 detectado previamente en forma directa por autorradiografía de las fosfoproteínas de membrana separadas electroforéticamente.

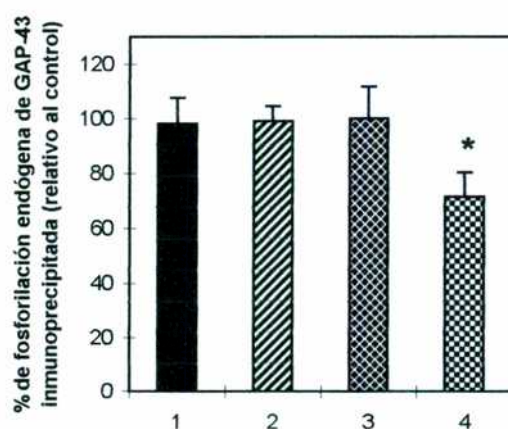
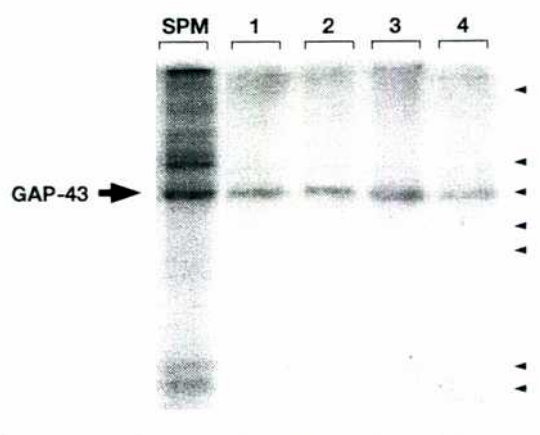


Figura 10: *Panel superior:* Autorradiografía representativa mostrando la fosforilación *in vitro* y posterior inmunoprecipitación de la proteína GAP-43 a partir de muestras de estriado ipsi y contralateral aislados a partir de animales controles y entrenados de 30 días de edad. Los animales fueron sacrificados a los 30 minutos post-entrenamientos. *Panel inferior:* Cuantificación densitométrica de la inmunoprecipitación de GAP-43. Los valores fueron expresados como porcentaje del máximo valor control y representan la media \pm SD. de 3 experimentos independientes medidos por triplicado. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95,5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12 KDa. 1- Control ipsi, 2- Entrenado ipsi, 3- Control contra, 4- Entrenado

contra. * $P < 0,05$ vs. control por el test *t* de Student para muestras no pareadas y* $P = 0,05$ vs. entrenado ipsi lateral por el test *t* de Student para muestras pareadas.

Ensayos semicuantitativos de western blot, realizados sobre las mismas fracciones donde se midió la fosforilación de GAP-43, demostraron que no existen diferencias en la concentración relativa de la proteína GAP-43 presente en dichas fracciones, en ninguno de los diferentes grupos experimentales y en ninguna de las edades testeadas (Fig 11).

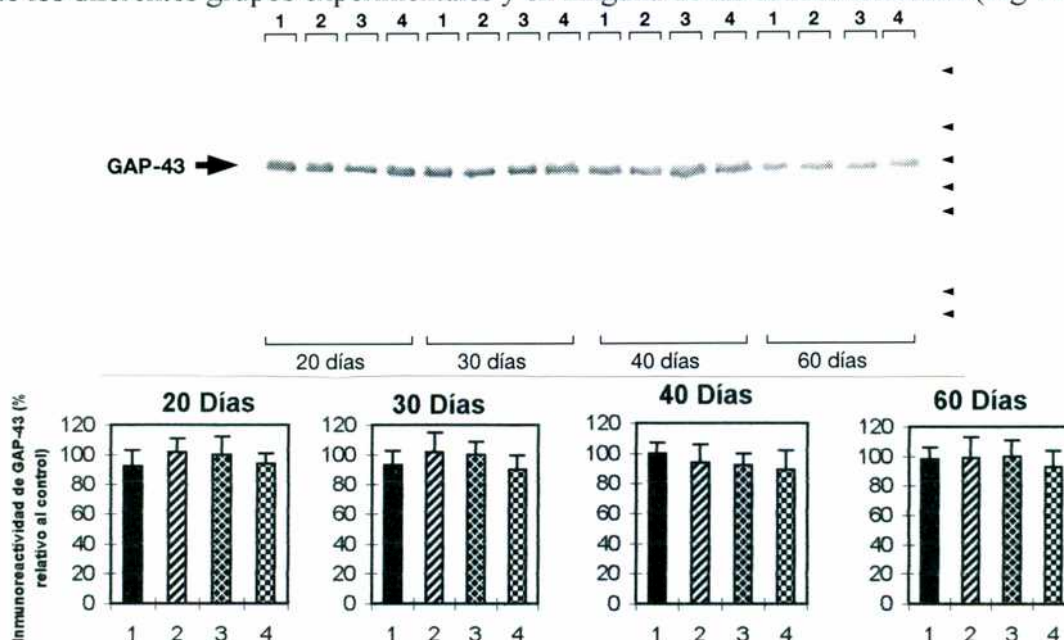


Figura 11: Análisis del nivel de GAP-43 en función del entrenamiento a distintas edades del desarrollo. Panel superior: Western blot representativo del nivel de inmunoreactividad de la proteína GAP-43/B-50. En cada calle se sembraron 20 μg de proteínas de MPS aisladas a partir de cuerpo estriado de ratas controles y entrenadas ipsi y contralaterales al sentido de giro. Los animales de 20, 30, 40 y 60 días fueron sacrificados 30 minutos post-entrenamiento. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95,5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12. **Panel inferior:** Cuantificación densitométrica del nivel de inmunoreactividad de GAP-43. Para cada edad los datos se expresaron como porcentaje del máximo valor control y representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes medidos por triplicado. 1- Control ipsilateral, 2- Entrenado ipsilateral, 3- Control contralateral, 4- Entrenado contralateral.

Las condiciones experimentales usadas para realizar los ensayos de fosforilación sugieren un rol de la PKC. Para comprobar si las diferencias detectadas en la fosforilación endógena de la proteína GAP-43 están relacionada con una reducción en el nivel de fosforilación en el sitio específico de la PKC (Ser-41), realizamos ensayos de fosforilación *post hoc* utilizando para ello PKC purificada a partir de cerebro bovino (2 pmoles/min.µl). El experimento que se muestra en la figura 12 fue realizado para ajustar la relación entre proteína de MPS y volumen de muestra de PKC bovina purificada, y el tiempo de reacción. En esta figura se observa que cuando se realizó el ensayo de fosforilación en ausencia de proteína de MPS, la fosforilación de proteínas sustratos contaminantes presentes en la muestra de PKC purificada, no produjo fosforilación de proteínas a la altura de 43 KDa, las cuales pueden interferir con el posterior análisis de la fosforilación exógena de GAP-43. Tampoco se observó actividad residual de kinasas después de inactivar por calentamiento a las membranas sinápticas estriatales, las cuales son la fuente de GAP-43 (Fig 12, calle 1 y 2). El patrón de fosforilación mostrado en esta figura es el patrón característico reportado por distintos laboratorios para la fosforilación, mediada por PKC de proteínas de MPS (Di Luca y col., 1991).

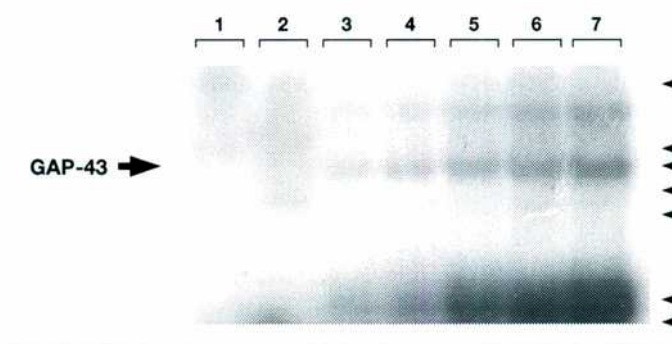


Figura 12: Autorradiografía representativa mostrando la fosforilación *in vitro* de proteínas de MPS realizada mediante el agregado exógeno de PKC bovina purificada. **Calle1:** Control de actividad endógena residual, MPS aisladas a partir de estriado inactivadas previamente durante 5 minutos a 100 °C para

partir de estriado inactivadas previamente durante 5 minutos a 100 ° C para eliminar las actividades de kinasas endógenas, sin agregado de kinasa exógena. Calle 2: Control de fosfoproteínas contaminantes presentes en la fracción de PKC bovina purificada, sin agregado de MPS de estriado. Calle 3-6: 10 µg de proteína de MPS de estriado. Las muestras sembradas fueron previamente fosforiladas en presencia de PKC exógena durante 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos y 10 minutos respectivamente. Calle 7: 20 µg de proteína de MPS de estriado previamente fosforiladas durante 10 minutos en presencia de PKC exógena.

Los experimentos se llevaron a cabo sobre membranas plasmáticas provenientes de animales de 30 días de edad sacrificados 30 minutos después de finalizado el entrenamiento circular. El ensayo de fosforilación fue realizado utilizando PKC purificada y [³²P-γ] ATP sobre membranas sinápticas cuyas actividades enzimáticas endógenas fueron previamente inactivadas por calentamiento (5 minutos a 100°C). Como se observa en la figura 13 los animales entrenados mostraron un incremento significativo del 22 % en la fosforilación exógena de GAP-43 mediada por PKC bovina en el estriado contralateral en relación al lado ipsilateral (P<0,05). Comparando contra los niveles controles, el estriado contralateral de los animales entrenados mostró un aumento del 21 % en la fosforilación exógena (P<0,05). Por lo tanto en el estriado contralateral la GAP-43, posee un menor nivel de fosfatos endógenos como consecuencia del entrenamiento circular. Estos resultados confirman que el entrenamiento circular produce un cambio asimétrico en el estado de fosforilación de la proteína GAP-43 en el hemisferio contralateral al sentido de giro. Estos cambios ocurren en el residuo Ser-41 de GAP-43, es decir en el sitio específico de fosforilación por PKC.

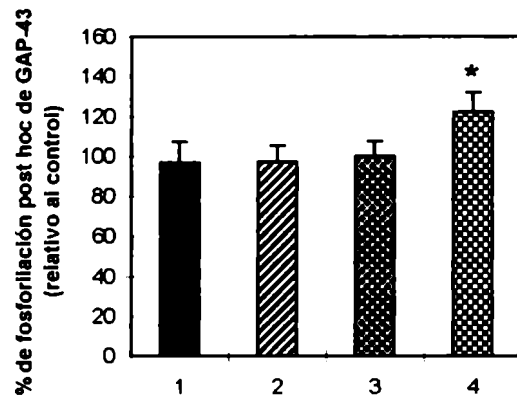
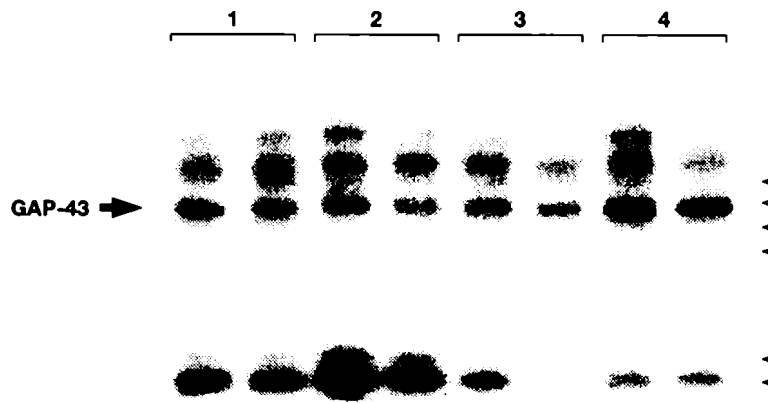


Figura 13: *Panel superior:* Autorradiografía representativa de un ensayo de fosforilación “post hoc” de proteínas de MPS aisladas a partir de estriados provenientes de animales controles y entrenados de 30 días de edad. El ensayo fue realizado mediante el agregado de PKC bovina purificada y ATP radioactivo luego de inactivar las MPS por calentamiento de 5 minutos a 100° C. En todos los casos los animales fueron sacrificados a los 30 minutos después de finalizado el TFC. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95, 5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12 kDa. *Panel inferior:* Cuantificación densitométrica de la fosforilación exógena de GAP-43 mediada por PKC. Los datos están expresados como el porcentaje del máximo valor control y

*representan la media \pm SD de 4 experimentos independientes medidos por cuadruplicado. 1- Control ipsilateral, 2- Entrenado ipsilateral, 3- Control contralateral, 4-entrenado contralateral. *P< 0,05 vs control por test t de Student para muestras no pareadas y vs. entrenado ipsilateral por test t de Student para muestras pareadas.*

5. El entrenamiento circular no modifica el estado de fosforilación de la proteína GAP-43/B-50 en corteza motora de rata de 30 días de edad.

Con el objeto de determinar si los cambios hasta aquí descriptos son específicos del estriado de rata a los 30 días de edad, se decidió estudiar la fosforilación endógena y exógena de la proteína GAP-43 en MPS obtenidas a partir de la corteza motora de animales controles y entrenados de 30 días de edad, sacrificados 30 minutos post entrenamiento. En todos los casos se discriminó entre corteza motora ipsi y contralateral al sentido de giro. Como se observa en la figura 14 los niveles de fosforilación endógenos y exógenos de esta proteína no estuvieron alterados en forma significativa por el entrenamiento circular ($P>0,1$).

estos mismos ensayos muestran una importante reducción en la fosforilación endógena y exógena de dos proteínas de aproximadamente 20 y 18 KDa cada una (indicadas con flechas pequeñas) luego del entrenamiento circular. Estos cambios ocurren bilateralmente en la corteza motoras a los 30 días de edad.

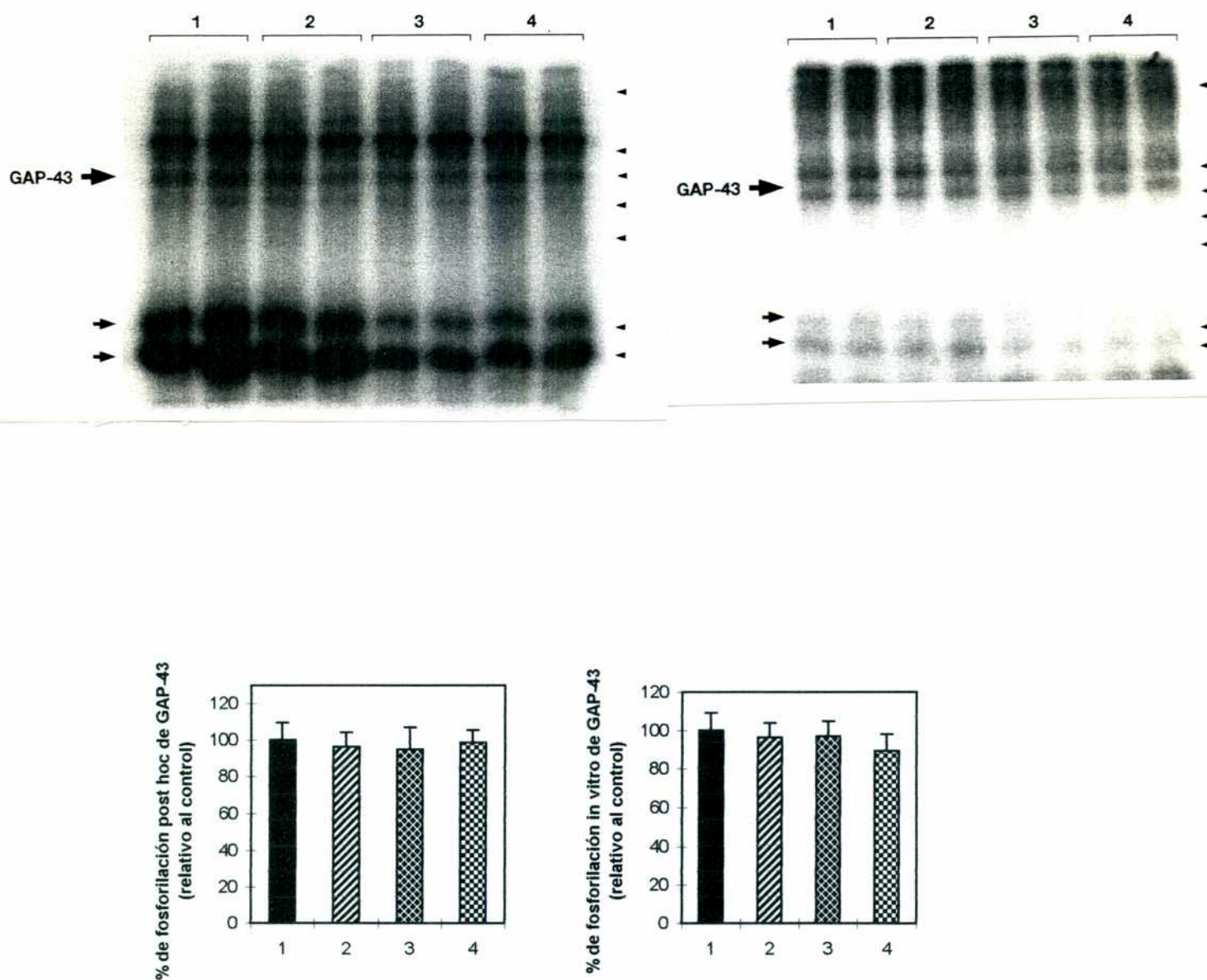


Figura 14: *Panel superior:* Autorradiografía correspondiente a un experimento representativo de fosforilación post hoc usando PKC exógena (izquierda) y de fosforilación endógena (derecha) de proteínas de MPS aisladas a partir de corteza motora de animales controles y entrenados de 30 días de edad. en todos los casos las cortezas motoras izquierda y derecha fueron procesadas en forma separada y los animales sacrificados 30 minutos post-entrenamiento. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95, 5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12 kDa. *Panel inferior:* Análisis densitométrico de la fosforilación

post hoc (izquierda) y endógena de GAP-43. Los datos están expresados como el porcentaje del máximo valor control y representan la media \pm SD de tres mediciones realizadas cada una por triplicado o cuadruplicado. 1- Control *contra*, 2- Control *ipsi*, 3- Entrenado *contra*, 4- Entrenado *ipsi*.

Ensayos de western blot demostraron que la proteína GAP-43 presente en membranas de corteza motora no muestra diferencias entre animales controles y entrenados, ni entre hemisferios *ipsi* vs *contralateral* al sentido de giro (Fig 15).

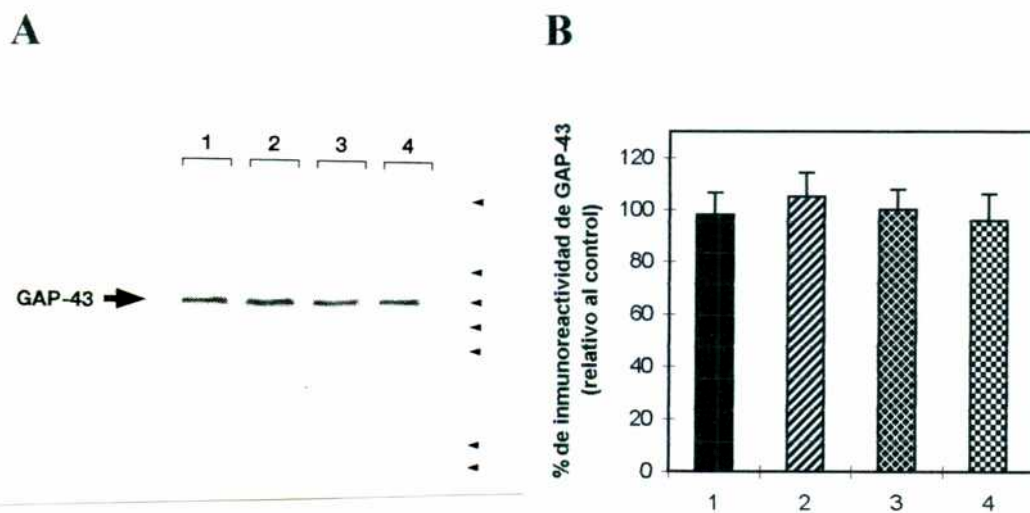


Figura 15: Panel A: Western blot representativo del nivel de inmunoreactividad de la proteína GAP-43/B-50. En cada calle se sembraron 20 μ g de proteínas de MPS aisladas a partir de corteza motora de ratas controles y entrenadas *ipsi* y *contralaterales* al sentido de giro. Se utilizaron animales de 30 días de edad, los cuales fueron sacrificados 30 minutos post-entrenamiento. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95,5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12. **Panel B:** Cuantificación densitométrica del nivel de inmunoreactividad de GAP-43. Los datos están expresados como porcentaje del máximo valor control y representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes medidos por triplicado. 1-Control *contra*, 2- Control *ipsi*, 3-Entrenado *contra*, 4- Entrenado *ipsi*.

Estos resultados sugieren que las modificaciones observadas anteriormente ocurren específicamente en el estriado de animales de 30 días a los 30 minutos post entrenamiento.

6. Participación de la PKC en los cambios asociados con el desarrollo postnatal del estriado de rata luego del entrenamiento circular.

Para determinar si la reducción en la fosforilación in vitro observada en la proteína GAP-43 es debida a una disminución en la actividad de PKC, esta actividad fue medida en fracciones de membranas sinápticas aisladas a partir de estriado de animales controles y entrenados. La actividad de PKC presente en MPS fue determinada usando activadores específicos (fosfatidilserina-PS- y TPA) y un exceso de histona como sustrato. La tabla 8 muestra los valores de actividad de PKC, expresados como picomoles/minuto mg de proteína total a distintas edades del desarrollo postnatal y discriminando entre hemisferio ipsi y contralateral al sentido de giro. La tabla 8 sugiere que no existen diferencias significativas en la actividad de PKC entre los distintos grupos experimentales en ninguna de las 4 edades estudiadas.

EDAD	Control ipsi	Entrenado ipsi	Control contra	Entrenado contra
20	71,06 ± 9,32	69,38 ± 8,24	66,94 ± 11,10	78,80 ± 10,50
30	69,85 ± 12,54	73,91 ± 9,18	62,37 ± 11,56	51,58 ± 15,32
40	67,3 ± 8,20	66,93 ± 7,50	66,20 ± 7,15	60,12 ± 12,01
60	62,8 ± 11,1	61,15 ± 9,30	64,80 ± 6,99	63,60 ± 8,70

Tabla 8: *Actividad de PKC presente en membranas sinápticas aisladas a partir de estriado de ratas de diferentes edades postnatales. Los valores están expresados como pmoles min . mg de proteína de MPS ± SD. n 3 experimentos*

medidos cada uno por cuadruplicado. Los animales fueron sacrificados 30 minutos post-entrenamiento.

Sin embargo debido a la alta variabilidad presente en las membranas plasmáticas correspondientes al estriado contralateral de animales entrenados a los 30 días de edad, se analizó individualmente cada uno de los tres experimentos, debido a que ellos provienen de animales que tuvieron diferentes performance motora (velocidad). Este análisis es apropiado, puesto que como se verá más adelante la caída en la fosforilación de la GAP-43 es dependiente de la velocidad desarrollada por los animales durante el TEC. Desde este punto de vista, el análisis de la actividad de PKC solamente mostró diferencias significativas entre los estriados contralateral e ipsilateral al sentido de giro provenientes de los animales entrenados. Los valores individuales y su respectiva significatividad estadística fueron los siguientes: **1)** Entrenado ipsi (EI): $68,39 \pm 4,46$ vs. Entrenado contra (EC): $46,42 \pm 5,07$ ($n=4$, $P < 0,01$); **2)** EI: $84,51 \pm 10,4$ vs. EC: $68,79 \pm 7,48$ ($n=4$, $P < 0,01$); **3)** EI: $67,83 \pm 8,5$ vs. EC: $39,5 \pm 6,61$ ($n=4$, $P < 0,05$). En ningún caso la comparación de los estriados controles izquierdo vs derecho o ipsi vs. contralateral mostró diferencias significativas **1)** Control ipsi (CI): $77,76 \pm 9,23$ vs. Control contra (CC): $66,77 \pm 4,12$; **2)** CI: $76,41 \pm 10,76$ vs. CC: $71,08 \pm 4,10$; **3)** CI: $55,39 \pm 8,06$ vs. CC: $49,25 \pm 7,12$. Estos resultados demuestran la participación de la PKC en los cambios asimétricos que ocurren en el estriado de rata luego de realizar el test de entrenamiento circular.

Además la medición de la actividad de PKC en la corteza motora de animales entrenados y controles de 30 días de edad tampoco mostró diferencias significativas en ninguno de los 4 grupos experimentales: CI: $82,06 \pm 9,15$; EI: $78,04 \pm 10,23$; CC: $81,43 \pm 9,63$ y EC: $73,75 \pm 10,28$.

7. Reducción en la fosforilación endógena de GAP-43 y su correlación con la velocidad desarrollada por los animales durante el TEC.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron la incidencia de la actividad motora en el grado de disminución en los niveles de neuroreceptores estriatales (Ibarra y col, 1995; Ibarra, 1997). Por lo tanto se realizó un estudio de correlación para

determinar el grado de asociación lineal entre el porcentaje de caída detectado en la fosforilación endógena de GAP-43 y la velocidad desarrollada por los animales durante el TEC. En cada uno de los experimentos se utilizaron 3 a 5 animales por grupo experimental. En cada caso los animales fueron agrupados según la velocidad desarrollada durante el TEC, de tal manera que el porcentaje de variación dentro de cada grupo fuese inferior al 10 % de la velocidad promedio. Graficando el porcentaje de caída en la fosforilación *in vitro* de la GAP-43 en función de la velocidad se encontró una correlación significativa entre estas dos variables (Fig 16, $r = 0,9443$, $P = 0,0046$).

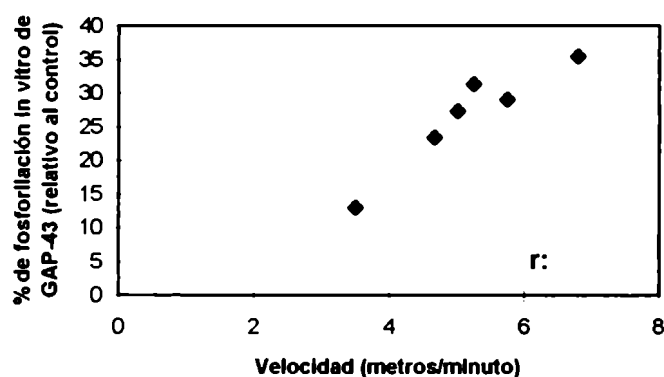


Figura 16: *Correlación entre el porcentaje de caída (respecto al control contralateral) en la fosforilación in vitro de GAP-43 y la velocidad desarrollada durante el entrenamiento en el TEC. Los animales fueron sacrificados 30 minutos post-entrenamiento. ($P = 0,0046$, $n = 6$ mediciones independientes)*

También se detectó una correlación significativa entre estas mismas variables cuando se comparó el porcentaje de caída en la fosforilación endógena de esta proteína entre los estriados contralateral e ipsilateral provenientes de animales entrenados (Fig 17, $r = 0,8813$, $P = 0,0203$). Estos resultados sugieren que la variación encontrada en la fosforilación de la GAP-43, luego de realizar un comportamiento motor de tipo circular, está relacionada con la velocidad desarrollada por los animales durante el test de entrenamiento.

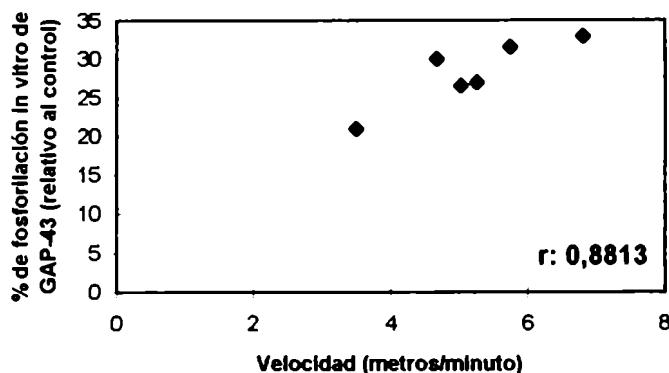


Figura 17: *Correlación entre el porcentaje de caída (respecto al estriado entrenado ipsilateral) en la fosforilación in vitro de GAP-43 y la velocidad desarrollada durante el entrenamiento en el TEC. Los animales fueron sacrificados 30 minutos post-entrenamiento. (P: 0,0203, n=6 mediciones independientes)*

8. El entrenamiento circular produce la inducción del protooncogén c-fos en estriado de ratas de 30 días

El proto-oncogén c-fos pertenece al grupo de genes de transcripción inmediata, los cuales son rápida y transcientemente inducidos sin necesidad de síntesis proteica previa a su inducción. Debido a que el protooncogén c-fos participa durante el desarrollo en diferentes modelos de plasticidad neuronal y dado que su inducción puede alterar la expresión de otros genes, se investigó si este podría jugar un rol en los procesos plásticos que ocurren en el estriado de rata de 30 días de edad luego de realizar estimulación fisiológica mediante el TEC (dos sesiones de entrenamiento).

Con el objeto de detectar específicamente el mRNA de c-fos se realizó una cinética de activación de dicho oncogen administrando el convulsivante metrazol a ratas adultas. Esta droga produce una importante inducción específica del c-fos. La Figura 18 muestra el aumento específico en los niveles de mRNA de c-fos, en corteza cerebral de rata, entre

los 30 y 60 minutos después de la administración del metrazol (50 mg/kg de peso). Estos resultados coinciden con los reportados por Morgan y col (1987).

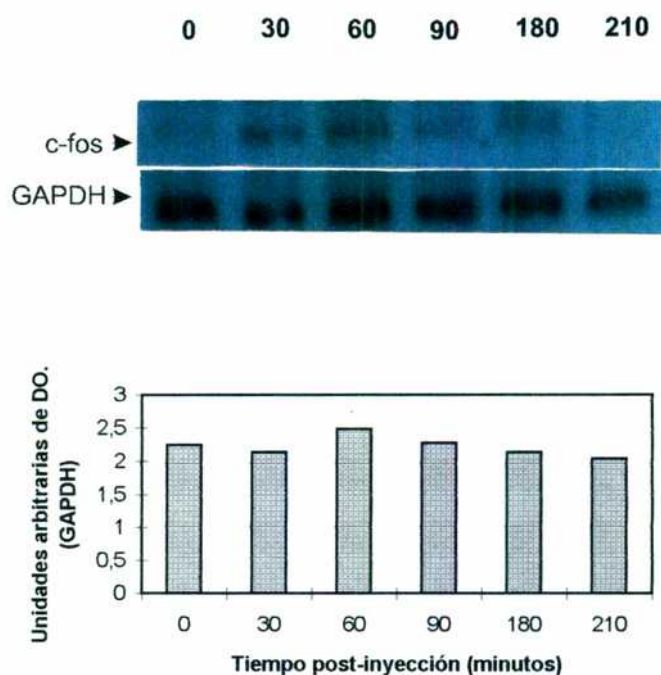


Figura 18: *Panel Superior:* Northern blot de *c-fos* mostrando la cinética de inducción de la expresión de este mensajero luego de inyectar ip el convulsivante metrazol, en una única dosis de 50 mg/kg de peso. En la figura se muestra la expresión del mRNA de GAPDH y la posición de los rRNA 28 S y 18 S. *Panel inferior:* Análisis densitométrico que muestra la expresión del mRNA de GAPDH.

Los niveles del mRNA de GAPDH (de expresión constitutiva), fueron testeados para descartar inducciones no específicas, debidas a errores en la cantidad de RNA total sembrado en cada calle. La figura 19 muestra la detección de ambos mensajeros en muestras obtenidas a partir de estriado de rata de 30 días de edad, que fueron sometidas al TEC y sacrificadas a los 0, 30, 60, 90 y 180 minutos, después de finalizado el mismo.

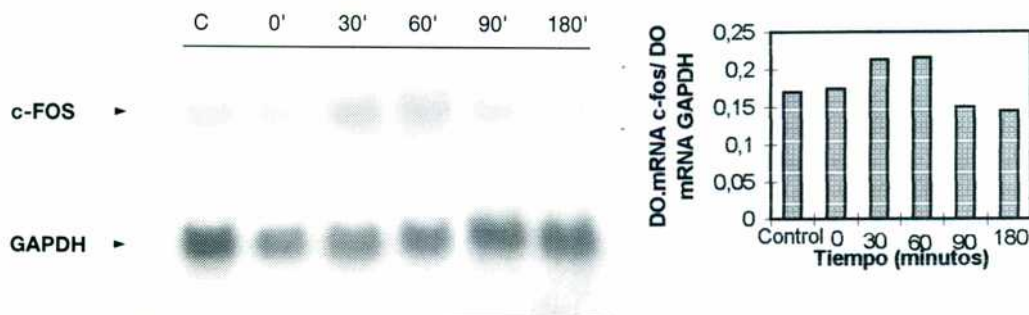


Figura 19: *Panel izquierdo:* Northern blot de *c-fos* mostrando la cinética de expresión luego de realizar el test de entrenamiento circular (TEC). Las muestras fueron obtenidas a partir de estriado total de animales controles y entrenados de 30 días de edad. Los animales entrenados fueron sacrificados a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos post-entrenamiento. Las cabazas de flecha indican la posición de los rRNA 28 S y 18 S. **Panel derecho:** Cuantificación densitométrica del nivel de expresión del mRNA de *c-fos* relativo al de GAPDH

Se observa que los niveles de *c-fos* están específicamente incrementados entre los 30 y 60 minutos post-entrenamiento (+27 %) en muestras de estriado total de rata. La cuantificación relativa al nivel de señal producida por GAPDH fue realizada solamente para esta autorradiografía (Fig 19), debido a que los niveles controles del *c-fos* superan levemente el nivel de detección. Estos cambios plásticos podrían estar mediando los cambios neuroquímicos de largo plazo demostrados previamente por nuestro laboratorio (Ibarra y col, 1995). Además demuestran que la estimulación fisiológica producida en el entrenamiento circular puede interactuar con los programas genéticos modificando (al menos en este período su expresión). El hecho de que a 0 minuto no se detectó inducción del *c-fos*, indican el carácter plástico de la inducción de este proto-oncogen.

9. Reducción en la fosforilación endógena de GAP-43 luego de la actividad motora circular desarrollada en el test de plataforma circular (TPG).

El test de entrenamiento circular es un test de comportamiento condicionado en el cual la habilidad para aprender y la destreza motora tienen influencia en la performance conductal de los animales (Brusés y Azcurra, 1993). Por lo tanto nosotros también

evaluamos el rol de la GAP-43 sometiendo animales a una actividad motora circular, utilizando para ésto una plataforma giratoria. La estimulación en la plataforma giratoria nos permite minimizar las actividades de aprendizaje asociativo y de motivación por la recompensa en relación a la actividad motora, dado que las ratas desarrollan una locomoción espontánea, sin necesidad de recompensa alguna y en dirección opuesta al sentido en que gira el disco. A diferencia del esquema de entrenamiento utilizado en el TEC, la estimulación motora utilizando plataforma giratoria requirió de una única sesión de actividad, dado que ésta fue suficiente para generar cambios bioquímicos en el estriado. Como se observa en la figura 20, los animales ejercitados en la plataforma giratoria mostraron una disminución promedio del 30,8 % en el nivel de fosforilación endógena de GAP-43 en el estriado contralateral respecto al lado ipsilateral también ejercitado ($P < 0,05$). En los animales controles no se encontraron diferencias asimétricas significativas entre los estriados izquierdo y derecho o cuando se agruparon los estriados como ipsi y contralateral, de acuerdo al respectivo grupo ejercitado. Además, la estimulación motora circular en el TPG produjo una reducción del 30,5 % en el nivel de fosforilación in vitro de GAP-43, representando una diferencia significativa respecto de los animales controles ($P < 0,01$). Estos cambios fueron observados a los 30 minutos después de finalizado el ejercicio físico, en el estriado contralateral al sentido de giro, independientemente de la dirección de giro elegida.

La figura 20 también muestra un aumento en la fosforilación endógena de una proteína de aproximadamente 50 KDa (flecha pequeña) en muestras de MPS aisladas a partir de estriado ipsilateral de animales entrenados, lo cual demuestra la participación del estriado ipsilateral en los cambios hasta aquí descriptos.

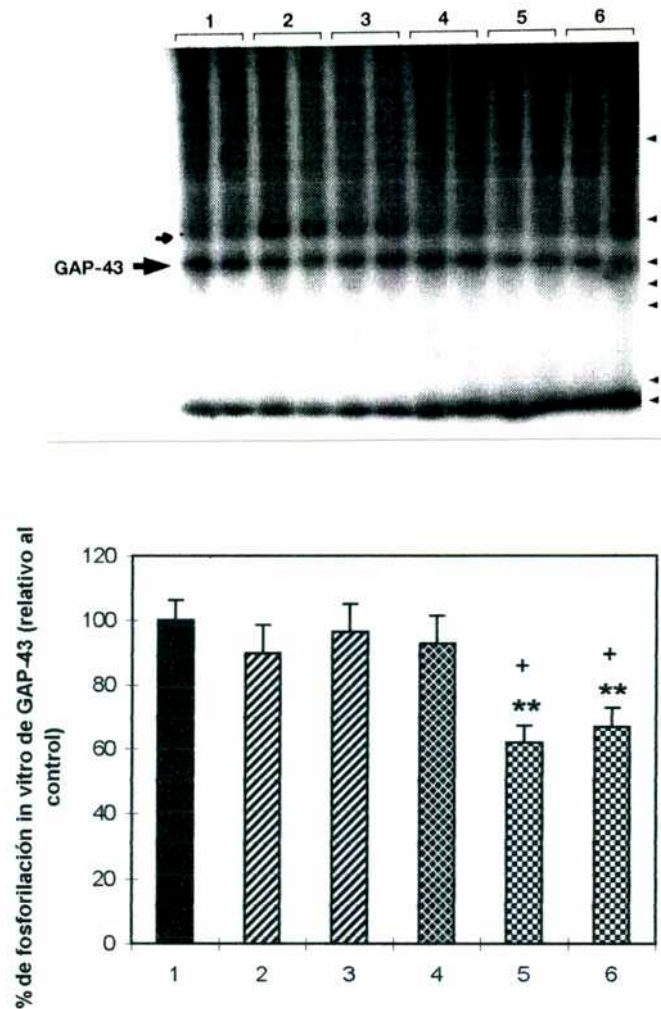


Figura 20: *Panel superior:* Autorradiografía representativa mostrando la fosforilación de proteínas de MPS aisladas a partir de estriado de ratas (30 días de edad) controles y ejercitadas, las cuales fueron sacrificadas 30 minutos después de finalizada la actividad motora circular. 1- Control ipsilateral, 2- Ejercitado ipsilateral (velocidad promedio-VP-: 10,65 m/min), 3- Ejercitado ipsilateral (VP: 7,45 m/min), 4-Control contralateral, 5- Ejercitado contralateral (VP: 10,65 m/min), 6- Ejercitado contralateral (VP: 7,45 m/min). Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95,5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12 Kda. *Panel inferior:* Cuantificación de la fosforilación endógena de GAP-43. Los se expresan como el porcentaje del máximo valor control y representan la media \pm SD de 4 experimentos independientes agrupados en función de la velocidad de giro. Cada determinación fue realizada por

*cuadruplicado. **: $P < 0,01$ vs. control por Student-Newman-Keuls y - : $P < 0,05$ vs. animales ejercitados ipsilaterales por test t de Student para muestras pareadas.*

Para estudiar una posible relación de estos cambios con la intensidad motora desarrollada (velocidad) por los animales durante la actividad física, las ratas fueron nuevamente agrupadas según sus velocidades (porcentaje de variación de velocidad dentro de cada grupo inferior al 10 % de la velocidad promedio). Graficando el porcentaje de caída en la fosforilación in vitro de la GAP-43 (relativo a los animales controles) en función de la velocidad, se encontró una correlación significativa entre estas dos variables (Fig.21, $r=0,9195$, $P=0,028$). Contrariamente el estudio de correlación entre el porcentaje de caída en la fosforilación in vitro de la GAP-43 (entrenado contralateral respecto al entrenado ipsilateral) y la velocidad desarrollada durante el TPG, no mostró diferencias significativas (Fig 22). Posiblemente sea necesario ampliar el número experimentos independientes para obtener una correlación significativa. Otra posibilidad radica en el hecho de que en este rango de velocidades los porcentajes de variación en la fosforilación de GAP-43 ya no son tan importantes.

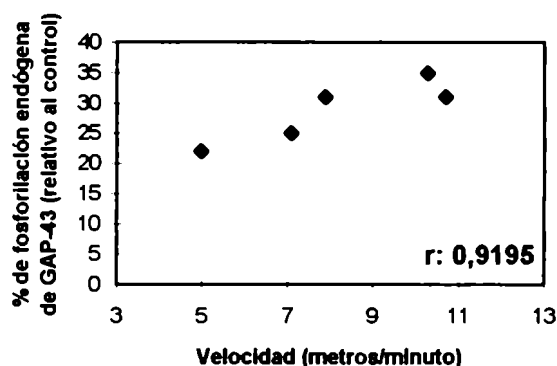


Figura 21: *Correlación entre el porcentaje de caída (respecto al control contralateral) en la fosforilación in vitro de GAP-43 y la velocidad desarrollada durante el entrenamiento en el TPG. Los animales fueron sacrificados 30 minutos después de finalizada la estimulación motora.. ($P=0,028$, $n=5$ mediciones independientes)*

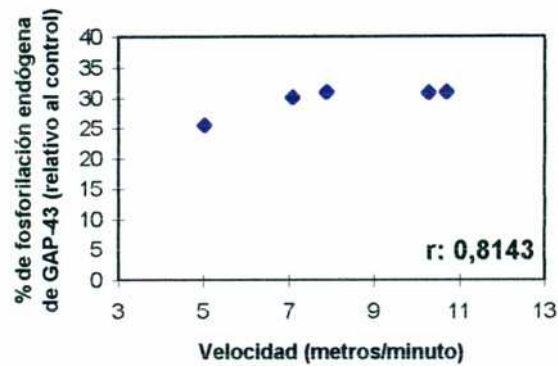


Figura 22: Correlación entre el porcentaje de caída (respecto al entrenado ipsilateral) en la fosforilación *in vitro* de GAP-43 y la velocidad desarrollada durante el entrenamiento en el TPG. Los animales fueron sacrificados 30 minutos después de finalizada la estimulación motora. ($P=0,0933$, $n=5$ mediciones independientes)

En ningún caso se observaron diferencias significativas en la cantidad de GAP-43 presente en MPS de los distintos grupos experimentales analizados (Fig.23).

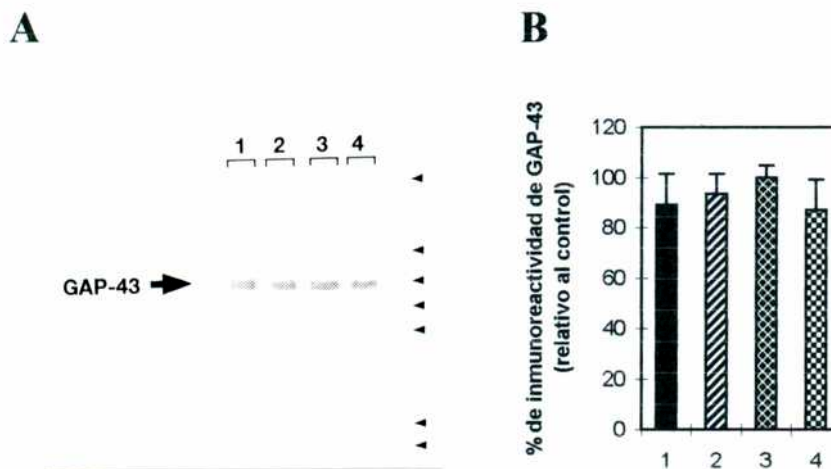


Figura 23: *Panel A* Western blot representativo del nivel de inmunoreactividad de la proteína GAP-43/B-50. En cada calle se sembraron 20 ug de proteínas de

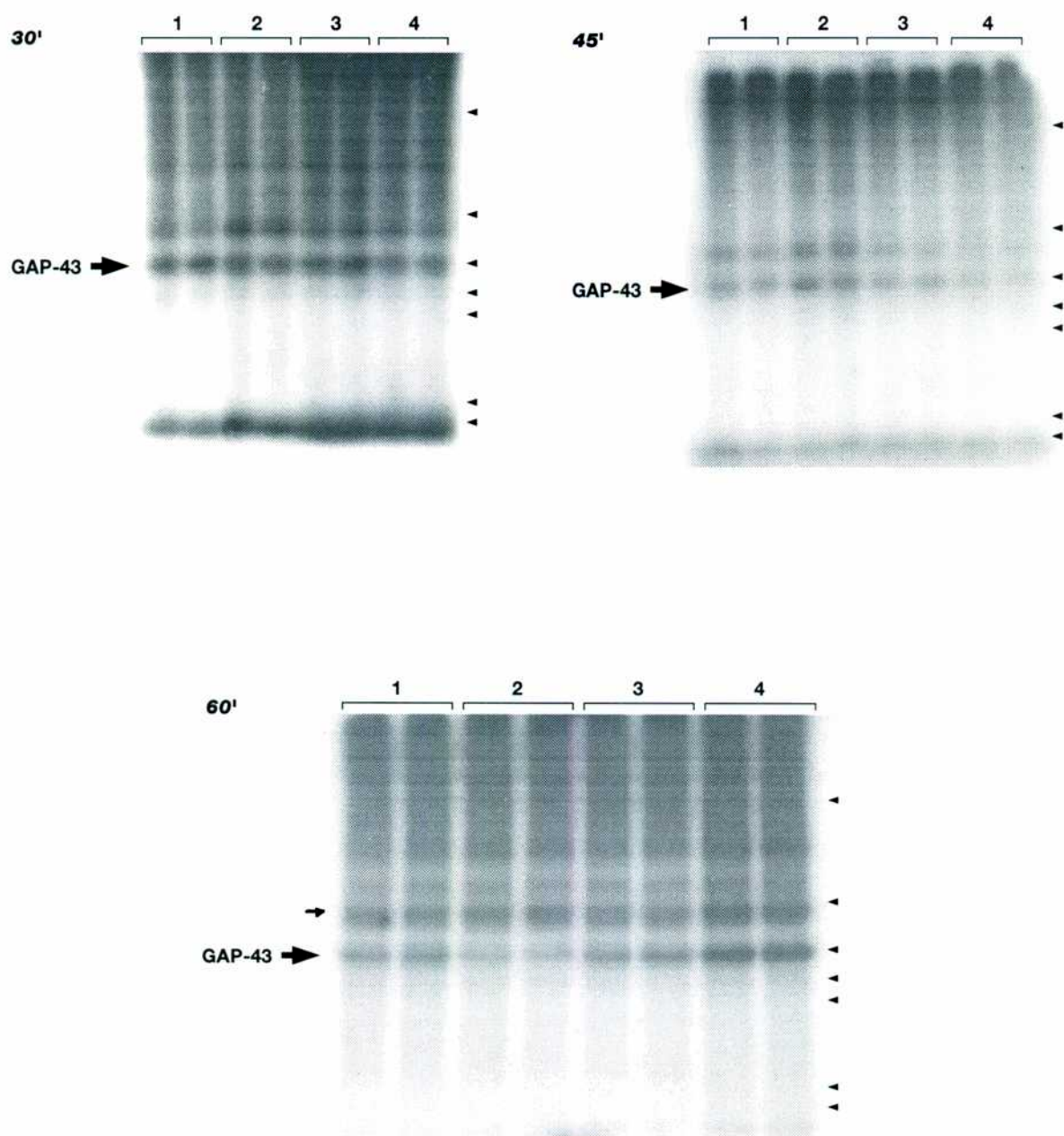
MPS aisladas a partir de cuerpo estriado de ratas (30 días de edad) controles y entrenadas ipsi y contralaterales al sentido de giro. Los animales fueron sacrificados 30 minutos post-entrenamiento. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95,5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12.

Panel B: Cuantificación densitométrica del nivel de inmunoreactividad de GAP-43. Los datos están expresados como porcentaje del máximo valor control y representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes medidos por triplicado. 1- Control ipsilateral, 2- Entrenado ipsilateral, 3- Control contralateral, 4- Entrenado contralateral.

10. Cinética de la fosforilación endógena de la proteína GAP-43/B-50 en estriado de ratas de 30 días luego de estimulación motora circular utilizando el TPG.

Debido a la mayor velocidad alcanzada por los animales en la plataforma giratoria, se realizaron estudios cinéticos de la fosforilación endógena de GAP-43 en animales sometidos a este test motor. La figura 24 muestra el perfil cinético de la fosforilación in vitro de GAP-43 a tiempos 0, 30, 45, 60 y 75 minutos después de finalizado el ejercicio físico. El análisis fue realizado en relación al estriado control respectivo y comparando entre sí los estriados provenientes de animales entrenados o controles. La figura 24 demuestra que inmediatamente después de finalizada la actividad motora (tiempo: 0 minuto) no se detectaron diferencias significativas en la fosforilación endógena de dicha proteína en ninguno de los dos estriados.

A



B

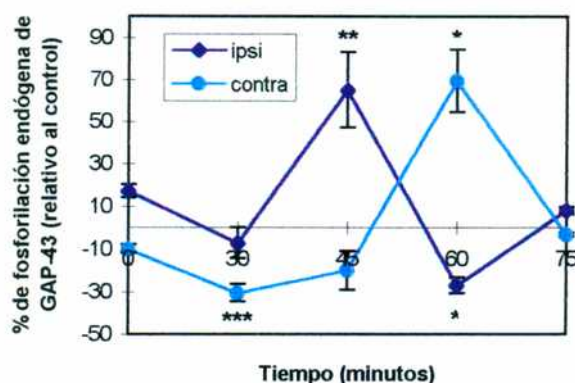


Figura 24: Panel A: Autorradiografías representativas de la cinética de fosforilación endógena de proteínas de MPS aisladas a partir de cuerpo estriado de ratas machos de 30 días controles y ejercitados en el TPG. En cada caso los estriados izquierdo y derecho fueron procesados en forma separada. Los animales fueron sacrificados a los 0, 30, 45, 60 y 75 minutos después de finalizado el ejercicio físico. La cuantificación densitométrica del nivel de fosforilación endógena de GAP-43 fue realizada para cada uno de los experimentos. 1- Control ipsi, 2- Entrenado ipsi, 3- Control contra, 4- Entrenado contra. Las cabezas de flecha indican la posición de los marcadores de peso molecular: 95,5; 55; 43; 36; 29; 18,5; 12 KDa. **Panel B:** Cinética del % de fosforilación endógena de GAP-43 relativa a los valores controles, discriminando entre hemisferios ipsi y contralateral al sentido de giro. Los valores están expresados como porcentaje del valor control respectivo, y representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes medidos cada uno por triplicado.

*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, por el test t de Student para muestras no pareadas.

Esto demuestra que las variaciones encontradas anteriormente están relacionadas posiblemente con mecanismos moduladores de los eventos plásticos, los cuales se disparan luego de finalizar la actividad motora. Además esta cinética se caracteriza por presentar una caída asimétrica seguida de un rebote en la fosforilación de GAP-43 para

cada uno de los estriados. En ambos casos incrementos en la fosforilación endógena de una banda de 52 KDa fueron detectados (Fig. 24 A, tiempos 45 y 60 minutos). El comportamiento oscilatorio y opuesto de los dos estriados parecería indicar la existencia de mecanismos plásticos de regulación interhemisféricas. En la figura 25 se analiza la cinética de fosforilación a través de la relación ipsi vs. contralateral que presentan los estriados de los animales sometidos al entrenamiento. En contraste, como no se observaron diferencias significativas entre los animales controles en ningún punto de la cinética, se expresó el valor control como un promedio de todas las relaciones controles (Fig. 25).

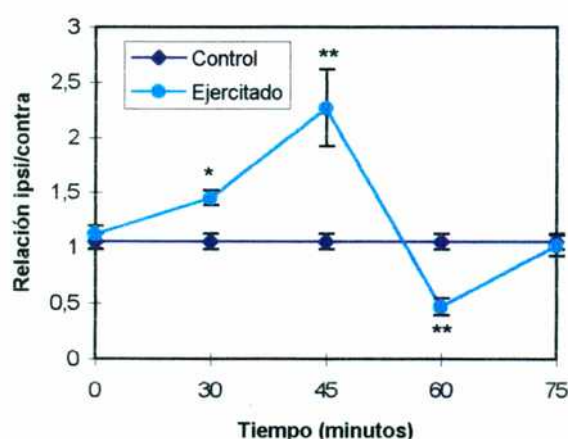


Figura 25: Cinética de la relación interestriatal ipsi/contra de la fosforilación endógena de GAP-43. Animales de 30 días de edad fueron sacrificados a los 0, 30, 45, 60 y 75 minutos después de finalizado el ejercicio físico. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, por el test de Dunnett después de ANOVA.

Otros marcadores neuroquímicos también mostraron un comportamiento inverso y asimétrico. La tabla 9 muestra que la actividad total de PKC se invierte entre los 30 y 60 minutos después de finalizado el entrenamiento. Además la tabla 10 muestra que la capacidad de unión a sitios muscarínicos se invierte a los mismos tiempos post-entrenamiento. En ningún caso se detectaron diferencias asimétricas entre los estriados izquierdo y derecho de los animales controles ni de los entrenados que fueron sacrificados inmediatamente después de finalizado el TPG. Estos resultados apoyan fuertemente la existencia de una regulación interhemisférica de tipo plástica.

	Ipsi	Contra
Control (No ejercitado)	66,95±8,07	62,04±7,90
Ejercitado, 0 minuto	70,41±9,02	63,51±10,62
Ejercitado, 30 minutos	76,59±5,77	50,07±5,68 *
Ejercitado, 60 minutos	59,37±7,84	83,78±10,66* */+

Tabla 9: *Actividad de PKC presente en membranas sinápticas aisladas a partir de estriado de ratas controles y ejercitadas de 30 días de edad. Los valores están expresados como pmoles·min . mg de proteína de MPS ± SD. n=3 experimentos medidos cada uno por cuadruplicado. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados en la tabla (0,30 o 60 minutos post-entrenamiento). *P<0,05 ejercitado 30 min. contralateral vs. ejercitado 30 min. ipsilateral y + P<0,05 entre ejercitado contralateral de 60 min. y control contralateral (Student pareado y Dunnett no pareado respectivamente). **P<0,01 entre ejercitado 6min. contralateral y ejercitado 60 min ipsilateral (Student pareado)*

	Ipsi	Contra
Control (no ejercitado)	2371±150	2484±318
Ejercitado, 0 minuto	2529±315	2319,63±205
Ejercitado, 30 minutos	1768±457	1145±340 **
Ejercitado, 60 minutos	1638±189 *	2412±401

Tabla 10: *Capacidad de unión de 3H-QNB a sitios receptores muscarínicos de membranas sinápticas aisladas a partir de estriado de ratas controles y ejercitadas de 30 días de edad.. Los valores están expresados como fmoles de 3H-QNB/mg de proteína de MPS± SD. n=3 experimentos medidos cada uno por cuadruplicado. Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados en la tabla (0, 30 o 60 minutos post-ejercicio). **P<0,01 vs. control contralateral por el test de Dunnett y *P<0,05 vs. control ipsilateral y ejercitado de 60 minutos contralateral por los tests de Dunnett y Student no pareado respectivamente.*

DISCUSION

1. Selección del modelo y de los marcadores neuroquímicos

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron la presencia de un periodo crítico durante el desarrollo postnatal del estriado de rata, en el cual la actividad motora fisiológica genera cambios permanentes en los niveles de receptores colinérgico muscarínico y dopaminérgico de tipo D1 y D2 (Ibarra y col, 1995; 1996; Ibarra 1997). También se observó una disminución del área dendrítica luego de realizar ensayos de inmunomarcación de neurofilamentos (Ibarra, 1997).

El objetivo del presente trabajo fue investigar la participación de la PKC y de su sustrato neuronal específico GAP-43/B-50 en la plasticidad motora durante el desarrollo postnatal del estriado de rata. Para llevar a cabo dicho estudio nosotros escogimos el test de entrenamiento circular (TEC) y el test de plataforma giratoria (TPG) como vías generadoras de la actividad motora.

El TEC es un paradigma comportamental que involucra componentes motoras, de aprendizaje asociativo y motivacionales (Brusés y Azcurra, 1993). Por este motivo, se utilizó el TPG como un test alternativo para inducir el comportamiento motor. Este test permitió evaluar los cambios neuroquímicos relacionados con el ejercicio físico, en la ausencia de componentes motivacionales y de aprendizaje asociativo.

Además de los cambios permanentes ya observados, otros mecanismos moleculares relacionados con actividad y plasticidad neuronal deberían experimentar modificaciones como consecuencia de la estimulación motora. De esta manera mecanismos moleculares de corto plazo podrían disparar los cambios de largo plazo observados en los niveles de neuroreceptores durante este periodo crítico del desarrollo del estriado. Como los procesos de fosforilación tienen una participación fundamental en la plasticidad sináptica, nosotros elegimos el sistema GAP-43/PKC para realizar las determinaciones neuroquímicas. Otras razones por las cuales se decidió estudiar a la PKC y en particular a la PKC sobre su sustrato GAP-43 fueron las siguientes: **a)** Ambas proteínas participan durante el desarrollo neuronal en la modulación de la liberación de neurotransmisores en el estriado (Dekker, 1989; Gnegy y col, 1993), **b)** Es considerado un efector de plasticidad sináptica (Schrama y col, 1994) ya que este sistema, asociado a transducción

de señales, participa en distintos modelos de plasticidad neuronal (LTP, procesos de memoria aversiva, sensibilización conductual a anfetaminas), c) La proteína GAP-43 está fuertemente relacionada con la función colinérgica estriatal presentando altos niveles de expresión en las interneuronas colinérgicas (Mc Kinney y Kent, 1994), d) Algunos subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) involucran activación de PKC (Hulme y col, 1990; Liles y col, 1986; EL-Fakahany y col, 1988).

Debido a que la actividad neuronal involucra una alta correlación entre diferentes parámetros bioquímicos y áreas cerebrales, el presente trabajo de tesis también involucró el estudio de marcadores neuroquímicos (c-fos, mAChR) y estructuras cerebrales relacionadas (corteza motora).

En función de lo hasta aquí expuesto, el trabajo experimental puede dividirse en 2 etapas: 1) Estudios de los cambios neuroquímicos producidos por el TEC sobre la fosforilación mediada por PKC de la proteína GAP-43 y sobre otros marcadores neuroquímicos relacionados. 2) Un análisis similar luego del TPG.

1.PARTE I

La actividad funcional desarrollada en el TEC produce cambios en el estado de fosforilación de la proteína GAP-43. Correlación con un período crítico del desarrollo postnatal del estriado de rata.

La primera parte de este trabajo fue realizada mediante el empleo del TEC y estudiando los cambios neuroquímicos que subyacen a la actividad funcional. El entrenamiento en el TEC generó una reducción en la fosforilación in vitro de la proteína GAP-43 cuando los animales fueron entrenados a los 30 días de edad, durante dos días. Esta disminución fue observada en el estriado contralateral al sentido de giro independientemente de la dirección elegida. La magnitud de dicha caída fue del 29,5 % cuando se compararon entre sí los estriados ipsi y contralateral correspondientes a los animales entrenados. La comparación relativa al grupo control respectivo determinó una disminución significativa del 29,3 %. El análisis conjunto de los ensayos de western blot y de fosforilación exógena con PKC purificada permitieron determinar que esta actividad

fisiológica produce un cambio en el estado de fosforilación de la proteína GAP-43 en el residuo Ser-41, el sitio de fosforilación específico para PKC.

Estos cambios neuroquímicos, producidos luego de realizar un comportamiento motor condicionado pueden estar relacionados con la actividad motora, con el aprendizaje asociativo, con factores motivacionales o bien con la combinación de alguno de éstos.

Si bien hasta el momento no existen evidencias concluyentes que vinculen en forma inequívoca al cuerpo estriado con el aprendizaje asociativo, también es cierto que estos mecanismos en el SNC no están totalmente descifrados. Existen evidencias que relacionan a la fosfoproteína GAP-43 y a la PKC en los procesos plásticos de aprendizaje y memoria, y durante el inicio del proceso de LTP. En este sentido, una reducción en la fosforilación de la proteína GAP-43 está correlacionada con alteraciones del aprendizaje asociativo, en ratas microencefálicas tratadas prenatalmente con el antimitótico metilazoximetanol (MAM) (Di Luca y col, 1991).

Por todo lo hasta aquí expuesto y debido al diseño experimental que presenta el TEC, no es posible excluir alguna de las variables mencionadas anteriormente como posibles factores generadores de estos cambios.

Un punto de interés fue descartar la interferencia de procesos neuronales relacionados con el stress hídrico producido durante el TEC. Al respecto existen evidencias de que la privación de agua puede producir cambios bioquímicos en las estructuras nerviosas (Sagar y col, 1988). Sin embargo, fue posible certificar que las variaciones neuroquímicas detectadas no están relacionadas con la privación hídrica, ya que los animales controles también fueron privados de agua, recibiendo un volumen similar al volumen promedio ingerido por los animales entrenados. En los primeros experimentos, donde también se trabajó con animales controles no privados de agua, éstos mostraron los mismos niveles de fosforilación endógena de GAP-43 que los controles privados. De esta manera la caída observada en la fosforilación está relacionada con la actividad fisiológica inducida por el TEC y no con la privación de agua. De la misma manera y para descartar posibles factores relacionados con la exposición a un ambiente nuevo (Morgan y col, 1984) los animales controles también fueron colocados en el tambor de entrenamiento con el aparato desconectado, permaneciendo en promedio el mismo tiempo que permanecieron los animales entrenados.

Debido a que diversos trabajos de investigación observaron características neuroquímicas asimétricas entre el cuerpo estriado izquierdo y derecho, nosotros realizamos el estudio separando en cada caso ambos estriados. El análisis por separado de ambos estriados también fue realizado debido a que en el TEC los animales desarrollan un comportamiento motor asimétrico, el cual también puede generar respuestas neuroquímicas diferenciales entre ambos hemisferios estriatales. Amplias evidencias demostraron la existencia de asimetrías interhemisféricas funcionales y bioquímicas entre ambos estriados. Estas fueron obtenidas tanto en animales intactos como en animales lesionados por administración unilateral de 6OH-DOPA en sustancia nigra (Rodríguez y col, 1990; Schneider y col, 1982; Robinson y Becker, 1982). Estas asimetrías estuvieron relacionadas con el sistema dopaminérgico e involucraron cambios en la dopamina, en su metabolito DOPAC y en la tasa de recambio presináptico de este neurotransmisor (Castellano y col, 1987; Gordon y col, 1994). Existen evidencias de que el comportamiento motor circular de tipo condicionado produce activación de las vías dopaminérgicas nigroestriatales (Yamamoto y Fredd, 1982). Estos trabajos describieron un aumento asimétrico en la concentración de DA y DOPAC en el caudado-putámen contralateral al sentido de giro. Estudios posteriores no pudieron confirmar dicha lateralización (Sabol y col, 1990). Una característica distintiva de estos trabajos y que lo diferencian de éste es que las determinaciones neuroquímicas fueron realizadas durante la estimulación funcional y no un período de tiempo después de finalizada la misma. Por lo tanto los cambios asimétricos de fosforilación aquí descritos podrían involucrar al sistema nigroestriatal y reflejar por lo tanto una modulación presináptica de la liberación de dopamina.

1.2. La respuesta neuroquímica al TEC es mayoritaria luego de la segunda sesión de entrenamiento (E2D)

Una característica que presenta la variación en la fosforilación endógena de la GAP-43 fue que la misma ocurre luego de la segunda sesión de entrenamiento circular. A este momento del entrenamiento los animales adquieren un determinado nivel de actividad motora (4 a 7 vueltas por minuto), el cual podría posibilitar el disparo y detección de

estos cambios neuroquímicos. Si bien luego de cuatro (E4D) y siete (E7D) sesiones nosotros detectamos una reducción del 16 % y 18 % respectivamente en la fosforilación de esta proteína, las mismas no fueron significativas. Recién al final de la cuarta sesión de entrenamiento circular los animales alcanzaron una estabilización de la velocidad la cual es mantenida hasta la séptima sesión (final del entrenamiento). Este nivel de actividad, si bien fue superior al nivel mostrado luego de la segunda sesión, no produjo una reducción significativa de la fosforilación. Estos resultados sugieren que esta variación neuroquímica no estaría relacionada con la actividad motora o bien que la misma requiere de una intensidad de actividad motora umbral, la cual una vez alcanzada posibilita el disparo masivo de estos mecanismos efectores de plasticidad. Al respecto ha sido descrito que la fosforilación de la GAP-43 y la PKC participan en la fase de adquisición de cambios plásticos relacionados con diferentes tipos de comportamientos condicionados (Scharenberg y col, 1991) y en los mecanismos iniciales que subyacen al LTP (Ramakers y col, 1995). En este mismo sentido, la baja actividad funcional realizada por los animales durante la primera sesión de entrenamiento, no permite producir los cambios bioquímicos hasta aquí descritos.

De esta manera, éstos cambios tempranos podrían estar relacionados con la reducción permanente de neuroreceptores estriatales generada luego de la estimulación funcional en el TEC. Si este fuera el caso, una respuesta temprana de tipo acumulativa podría explicar la correlación detectada a largo plazo entre la caída de receptores y los metros recorridos por los animales durante un máximo de siete sesiones de entrenamiento circular.

1.3. La respuesta se correlaciona con la velocidad desarrollada durante el TEC.

La detección de cambios en la fosforilación endógena de GAP-43 fue realizada luego de entrenar a los animales durante dos sesiones consecutivas en el TEC. Con el objeto de obtener una aproximación acerca del factor generador de éstos cambios se analizó en primer lugar la posible correlación entre la caída en la fosforilación de GAP-43 y la velocidad desarrollada por los animales durante la segunda sesión (E2D). En segundo lugar este cambio neuroquímico se analizó en función del número de errores asociativos (EA) producido en la misma sesión de entrenamiento.

Este segundo análisis permitió concluir que el aprendizaje asociativo, al menos evaluado en función de los EA, no mostró una correlación con los cambios observados sobre la proteína GAP-43. Contrariamente, la reducción en la fosforilación de la GAP-43 está significativamente correlacionada con la velocidad desarrollada por los animales durante ésta sesión de entrenamiento.

Trabajos previos realizados por Freed y Yamamoto (1985) demostraron que se necesita alcanzar una determinada intensidad o velocidad de giro para disparar cambios neuroquímicos en el sistema dopaminérgico nigroestriatal. Es posible por lo tanto que la intensidad sea un factor necesario, pero que una vez alcanzado un umbral los cambios neuroquímicos sean menores en función del tiempo en que los mecanismos intervinientes se encuentran activos. Una correlación entre la fosforilación in vitro de la GAP-43 y la actividad locomotora fue observada por Sheu y col (1993). La relación fue detectada en el estriado intermedio y medio ventral (IMHV) de pollo recién nacido sometidos a entrenamiento de impronta. El esquema experimental utilizado aquí requirió de actividad locomotora sobre una rueda giratoria. A pesar de esto cambios significativos en la fosforilación de la GAP-43 no fueron observados en ésta misma área. El IMHV no es una estructura análoga al estriado de mamífero. Extrañamente y a pesar de que el IMHV es un área involucrada en memoria de largo plazo, cambios relacionados con la fuerza de aprendizaje tampoco fueron detectados. Debido a esto no está clara aún la significancia biológica de la correlación mencionada anteriormente por estos autores.

1.4. Los cambios se correlacionan con un período crítico asociado al desarrollo del estriado de rata

Otra características de la caída en la fosforilación endógena de la GAP-43 y de la variación asimétrica de la actividad de PKC fue que estas diferencias sólo se produjeron durante un período determinado del desarrollo postnatal.

El entrenamiento circular realizado antes (a partir de los 20 días de edad) o inmediatamente después (40 o 60 días) no generan variaciones significativas en estos marcadores neuroquímicos. Esto confirma la presencia de un período crítico durante el desarrollo del cuerpo estriado de rata. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio

utilizando el TEC demostraron la presencia de este periodo de sensibilidad. La estimulación funcional en el TEC produjo también una reducción permanente en el número de receptores mACh y dopaminérgico D1 y D2 sólo cuando los animales fueron entrenados a los 30 días de edad (Ibarra y col, 1996; Ibarra 1997).

Esto demuestra que la actividad funcional produce cambios neuroquímicos en esta estructura cerebral sólo durante un “periodo crítico”. Un “periodo de sensibilidad” fue previamente descrito por Hubel y Wiesel (1962) luego de estudiar la plasticidad del sistema visual.

Aunque el periodo crítico estriatal no fue aún bien definido (al menos entre los días 23 y 40), éste no se prolonga por más de 20 días. Contrariamente el periodo crítico del sistema visual tiene una duración de 50 días (Dudek y Bear, 1989) y presenta una aparición y desaparición gradual, la cual se relaciona con una declinación progresiva durante el desarrollo de la función del receptor de NMDA en la capa cuatro de la corteza visual (Kirkwood y col., 1995).

Los cambios neuroquímicos detectados durante este periodo crítico estriatal implican la combinación de una actividad funcional (respuesta al TEC) y una base genética (periodo de sensibilidad). Por lo tanto deberían existir diferencias moleculares y celulares distintivas de este periodo, las cuales posibilitan el cambio en la fosforilación de la GAP-43 y en la actividad de PKC. Estos mismos factores deberían estar ausentes o bien estar en niveles superiores o inferiores a los detectados durante dicho periodo de sensibilidad. Debido a la compleja interrelación circuital y funcional presente en el cuerpo estriado, como así también a la interacción moduladora que ejercen otras áreas del SNC, resulta difícil determinar las causas por las cuales estos cambios ocurren en el estriado de 30 días.

La falta de una respuesta a los 20 días podría estar relacionada con una inmadurez de las vías involucradas en ese momento. Los sistemas colinérgicos y dopaminérgicos maduran en forma temprana en el cuerpo estriado, presentando niveles importantes a los 20 días de edad. Sin embargo las actividades de las enzimas tirosina hidroxilasa (presente en terminales dopaminérgicos) y colina acetil transferasa (en terminales colinérgicos), alcanzan entre un 70-75% de la actividad presente en el estriado adulto recién el día PN28 (Coyle y Campochiaro, 1976). También la cantidad de receptores dopaminérgicos alcanzan los valores del adulto al final del primer mes de vida (Pardo y col., 1977). Por

otra parte estudios ontogénicos también demuestran que alrededor de los 30 días de vida postnatal existe una tendencia a la estabilización de los parámetros relacionados con la neurotransmisión colinérgica luego de haber alcanzado sus niveles máximos.

Una característica distintiva de la maduración de los sistemas de neurotransmisión estriatales está dada por el hecho de que diversos sistemas de neuropéptidos maduran en forma posterior, modulados por los sistemas de neurotransmisión clásicos, representando de esta manera una segunda etapa del desarrollo neuroquímico del cuerpo estriado (Sivam y col, 1991; Pérez-Navarro y col, 1993). Una función de los neuropéptidos puede ser la modulación presináptica de la neurotransmisión de ciertas vías neuronales, inhibiendo o estimulándola (Mulder y col., 1984). La dinorfina inhibe selectivamente la liberación de dopamina en secciones de cuerpo estriado actuando a través de los receptores de tipo κ . Agonistas de los receptores opioides del tipo δ inhiben la liberación de acetilcolina estriatal. Estas son posibles causas por las cuales el TEC no puede generar los cambios relacionados con la fosforilación de la GAP-43 y la actividad de PKC.

Sin embargo el TEC no produce cambios al menos a partir de los 40 días de edad. Sin poder determinar las razones que originan las variaciones neuroquímicas es posible que a medida que el SNC madura distintos eventos plásticos comiencen a ser restringidos, y éste sea posiblemente un ejemplo más.

1.5. Posibles eventos relacionados con la disminución del estado de fosforilación de la GAP-43 en el sitio específico de la PKC

La fosforilación de esta proteína incrementa la liberación de neurotransmisores (Dekker y col., 1989; Gnegy y col., 1993). Contrariamente nosotros detectamos una reducción en su estado de fosforilación. Estos cambios observados *in vitro* podrían indicar una disminución en la neurotransmisión estriatal. Un punto importante se relaciona con el hecho de que esta modificación fue observada 30 minutos después de finalizada la estimulación funcional en el TEC, pero no inmediatamente después de realizar el comportamiento motor condicionado (tiempo 0 minuto). Por lo tanto es probable que estas modificaciones jueguen un rol modulador durante los eventos

plásticos disparados después de completar la estimulación funcional. Al respecto, Gnegy y col. (1993) determinaron que la fosforilación de la proteína GAP-43 participa en los mecanismos moduladores de liberación de neurotransmisores en el estriado de rata luego de administración de AMPH.

Debido a la participación de la GAP-43 y la PKC en los mecanismos plásticos cerebrales, estas modificaciones podrían estar relacionadas con los cambios permanentes observados en los niveles de neuroreceptores estriatales durante el mismo período crítico postnatal.

Como fue discutido anteriormente estos cambios ocurren una vez completada la maduración funcional y morfológica del estriado (Coyle y Campochiaro, 1976). Por lo tanto en este momento del desarrollo, un ajuste funcional en la sinapsis estriatales podría estar ocurriendo en los sistemas de neurotransmisión moduladores como consecuencia de la actividad fisiológica. La posible existencia de conexiones con plasticidad diferencial, dependiente de la actividad, al final de la morfogénesis fue propuesta por Singer para las cortezas sensoriales (Singer, 1995). Investigaciones posteriores deberán demostrar si es posible una descripción comparable en una estructura subcortical como es el estriado.

Según Singer existen 2 tipos de conexiones neuronales : a) las alimentadoras de redes (feedforward) y b) conexiones susceptibles a modificaciones plásticas dependientes de la experiencia. Ambos tipos de conexiones permiten hacer frente a los problemas combinatoriales relacionados con la gran cantidad de representaciones sinápticas posibles a partir del alto número de neuronas existentes.

A medida que procede el desarrollo, las conexiones alimentadoras pierden mucho de su plasticidad funcional, mientras que las sinapsis correspondientes a las conexiones de agrupamiento recíproco, dependientes de la experiencia, retienen un alto grado de susceptibilidad a las modificaciones plásticas dependientes del uso. Esta particularidad de las conexiones recíprocas posibilitará generar representaciones corticales relacionadas con nuevas percepciones y patrones motores a lo largo de la vida. De esta manera se explica parte de la plasticidad neuronal remanente con que operan ciertas áreas del cerebro adulto. Estos remodelamientos de las conexiones dependientes de la actividad requieren de mecanismos plásticos de potenciación y depresión sináptica (LTP y LTD). La actividad sináptica a través de receptores de NMDA participa en algunos aspectos del

refinamiento del sistema visual durante el desarrollo. En el tálamo el bloqueo del receptor de NMDA impide la segregación en subcapas de las aferencias retinogénicas.

Un aumento en la fosforilación de la GAP-43 mediado por PKC ha sido observado luego de llevar a cabo una estimulación de alta frecuencia la cual induce LTP (Lovinger y col., 1986). Estudios similares realizados en secciones de hipocampo también demostraron *in situ* el aumento de la fosforilación de GAP-43 (Gianotti y col., 1992; Ramakers y col., 1995).

El incremento observado en la fosforilación endógena de la proteína GAP-43 (ver cinética durante el test de TPG) y la participación asimétrica de la PKC podrían reflejar la presencia de mecanismos de refuerzo sináptico similares a un LTP. De esta manera los cambios neuroquímicos detectados podrían estar reflejando los pasos iniciales mediante los cuales los circuitos sinápticos estriatales pueden ser modificados como consecuencia del comportamiento motor condicionado o por la actividad motora desarrollada en el TEC y TPG, respectivamente. Estos resultados sugieren que una cierta semejanza neuroquímica (GAP-43, PKC, c-fos) puede ser trazada entre algunos modelos de plasticidad sináptica (LTP, modelos de aprendizaje y memoria, sensibilización conductal a anfetaminas). Al respecto cambios en la actividad de PKC y en la fosforilación endógena de GAP-43 fueron detectados luego de realizar un entrenamiento de aprendizaje aversivo (Camarota y col, 1997). Este último trabajo fue realizado en el marco de una investigación conjunta entre nuestro laboratorio y el laboratorio del Dr. J. Medina (se anexa la publicación). Si bien poco se conoce acerca de los mecanismos presinápticos que subyacen a la inducción postsináptica del LTD, una modulación bidireccional recíproca en la función sináptica no puede ser excluida. De esta manera, durante el mecanismo de LTP una participación sináptica integral (pre y post) ha sido descrita. Por lo tanto, como consecuencia del disparo postsináptico del LTD, variaciones neuroquímicas posteriores en la presinápsis podrían ocurrir. La reducción en el estado de fosforilación de la proteína GAP-43 podría reflejar una disminución de la liberación plástica de neurotransmisores y por lo tanto ser un indicador de la depresión sináptica de ciertas vías. Al momento no existen pruebas que vinculen la fosforilación de esta proteína a los mecanismos de LTD. Que el LTD sea visto como un mecanismo opuesto al LTP, y viceversa, y que ambos mecanismos converjan, al menos

postsinápticamente en la activación de kinasas y fosfatasas específicas, apoyarían esta hipótesis. Por lo tanto la reducción en la fosforilación de la GAP-43 sería en la presinápsis la resultante del disparo postsináptico de mecanismos depresivos.

También cabe señalar que la proteína GAP-43 une calmodulina (CAM) en una zona adyacente al sitio específico de fosforilación por PKC. Esta unión es disociada por fosforilación mediada por PKC (Alexander y col., 1987; 1988; Apel y col., 1987; Gerendasy y col., 1995). De esta manera la regulación del estado de fosforilación de la GAP-43 (a través de PKC y calcineurina) puede modular las vías de transducción de señales dependientes de Ca^{2+} /CAM. Esto puede regular los niveles de calmodulina en el microambiente de la MP e influir de esta manera sobre la actividad de la CAMKII (Spencer y Willard, 1992; Schulman, 1993).

Hasta el momento no se han determinado los mecanismos moleculares por los cuales el TEC produce una reducción en el estado de fosforilación de esta proteína. Si bien se ha observado una reducción en la actividad de PKC en el estriado contralateral respecto del ipsilateral, no se puede descartar la participación de fosfatasas. Existen evidencias de una reducción en la fosforilación endógena de GAP-43 debidas a una reducción en la actividad de PKC en MP obtenidas a partir de hipocampo de animales microencefálicos (Di Luca y col, 1991). Las diferencias relacionadas con el nivel de detección de los cambios neuroquímicos de la fosforilación de GAP-43 o de la actividad total de PKC pueden ser explicados a través de diferencias en la sensibilidad de detección. Estas diferencias de sensibilidad pueden ser explicadas por el hecho de que en la medición de PKC total participan todas las isoenzimas de PKC presentes en la MP pre y postsináptica, las cuales pueden enmascarar las diferencias observadas sobre un sustrato endógeno y presináptico como es la GAP-43. A pesar de esto tampoco se puede descartar una participación postsináptica de la PKC.

Tanto el LTP como el LTD son mecanismos que requieren la activación de receptores de NMDA (Linden, 1993) y se ha propuesto su participación en la determinación de rearrreglos sinápticos dependientes de la actividad y durante el desarrollo. En el estriado la reorganización de las conexiones sinápticas podría involucrar al menos en parte a las vías glutamatérgicas y a los recetores de NMDA sobre las neuronas colinérgicas y GABAérgicas del estriado. Estudios recientes han identificado nuevas formas de modulación de corto y largo plazo relacionadas con las sinápsis inhibitorias

GABAérgicas. Komatsu e Iwakiri demostraron que en la corteza el LTP puede ser inducido en las sinapsis inhibitorias. También demostraron la dependencia de la edad sobre estos efectos (Komatsu e Iwakiri, 1993; Komatsu, 1994).

Cambios morfológicos en la sinápsis también representan una expresión de plasticidad sináptica. La GAP-43 es una proteína presináptica asociada con el citoesqueleto de membrana (Meiri y Gordon-Weeks, 1990). Aunque los eventos moleculares que conducen a los cambios morfológicos en las sinápsis no están totalmente dilucidados, la participación de esta proteína durante la sinaptogénesis (Neve y col, 1991) y durante el crecimiento nervioso, sugieren que podría tener un rol en las etapas finales relacionadas con la reorganización de ciertas conexiones.

1.6. La inducción del c-fos: posible relación con los cambios plásticos.

El c-fos participa en la plasticidad dependiente de la actividad y su expresión puede ser importante para la determinación de propiedades neuronales relacionadas con cambios plásticos ontogénicos (Arnauld y col, 1994). Debido a que en el estriado de 30 días de edad tanto la actividad fisiológica producida en el TEC como la estimulación motora generada en el TPG (Ibarra 1997) aumentan respectivamente los niveles de mRNA y proteína de c-fos sugieren que este marcador plástico puede tener una participación directa en este período crítico. Los estudios inmunohistoquímicos de c-fos llevados a cabo en nuestro laboratorio no identifican a qué población neuronal pertenecen las células c-fos positivas. Estos mismos estudios muestran que la misma está restringida a un pequeño agrupamiento de células que representa aproximadamente un 10% del total de la sección.

El control dopaminérgico de la expresión del c-fos fue ampliamente estudiado en el caudado putámen adulto (Dragunow y col, 1990; Merchant y Dorsa 1993; Miller 1990). Estos trabajos sugieren que la inducción del c-fos ocurre a través de la estimulación del receptor dopaminérgico D1 y requiere de una variación en la sensibilidad de estos receptores o un imbalance funcional entre los subtipos D1 y D2. Estudios ontogénicos demostraron que durante la vida postnatal temprana agonistas de los receptores D1 inducen la expresión transiente del c-fos. Esta es máxima y masiva a los 3 días PN y

luego decrece paulatinamente hasta ser casi nula en PN21, PN30 y en el animal adulto (Arnauld y col., 1994). Sólo la región caudal del estriado retiene un patrón de respuesta fos positiva luego del tratamiento del estriado adulto con agonistas D1. Esto podría indicar que el bajo número relativo de núcleos neuronales que están expresando el c-fos se relacionan con una disminución de la función de este oncogén en los fenómenos de plasticidad motora. Estudios inmunohistoquímicos a distintas edades y que permitan caracterizar el tipo de neuromodulador presente en estas células fos positivas, pueden traer luz acerca de su posible participación en la plasticidad motora. También puede suceder que la detección de un pequeño número de neuronas positivas signifique la existencia de procesos neuronales de amplias connotaciones relacionadas con la activación y plasticidad motora.

2. PARTE II

2.1. Los cambios se deben a la actividad motora y no al aprendizaje asociativo

La comparación de la respuesta neuroquímica obtenida luego de utilizar el TEC y el TPG permitió caracterizar dichas variaciones. Como fue discutido oportunamente la variedad de factores presentes durante el comportamiento motor condicionado en el TEC, no nos permitió concluir que la respuesta neuroquímica detectada es consecuencia de la actividad motora producida. De todas maneras existen evidencias que permiten suponerlo. Los animales de 30, 40 y 60 días no mostraron diferencias significativas en el número de errores asociativos, tomados como una medida de aprendizaje. Contrariamente los animales de 20 días presentaron el mayor número de EA, lo cual determina una diferencia comportamental respecto a las demás edades testeadas. Estos resultados contradicen la posibilidad de que los cambios neuroquímicos se deban a la variable aprendizaje asociativo. Primeramente, no puede explicarse por qué si los animales de 30, 40 y 60 días responden en forma homogénea desde el punto de vista del comportamiento asociativo, sólo los animales de 30 días experimentan las variaciones neuroquímicas. Además, el grupo de animales de 20 días de edad, debería presentar

alteraciones neuroquímicas que los distinguen de todos los demás grupos de edad testeados.

Además se analizaron las mismas variables neuroquímicas utilizando el TPG, para producir estimulación motora fisiológica sin interferencia de componentes de aprendizaje asociativos. Durante el desarrollo del TPG, los animales corren en forma voluntaria sobre una plataforma circular en movimiento sin necesidad de recompensar dicha actividad. Esto último representa una clara diferencia respecto al TEC, ya que aquí los animales no sufren estrés hídrico. De todas maneras no pueden descartarse componentes motivacionales relacionados con el hecho de que el animal decida moverse sobre la plataforma en movimiento.

La actividad motora desarrollada en el TPG también presenta algunas características que lo diferencian del TEC. En el TPG, como su nombre lo indica la plataforma se mueve en dirección opuesta al sentido de giro del animal mientras que en el TEC el piso está fijo. Además en el TPG la actividad motora es regular y constante. En el TEC el animal gira rápidamente hasta donde se suministra el reforzador, demora algunos segundos en beberlo y vuelve a acelerar para realizar un nuevo giro. También es oportuno aclarar que el TEC en la segunda sesión de entrenamiento (E2D) posee intervalos de tiempo en los cuales el animal no realiza actividad motora, posiblemente debido a las características asociativas y motivacionales que presenta dicho test.

El ejercicio físico realizado en TPG produjo una reducción significativa en la fosforilación endógena de la GAP-43 en el cuerpo estriado contralateral al sentido de giro. La magnitud de dicha caída fue del 30,5 % respecto al grupo control y del 30,8 % respecto al estriado ipsilateral correspondiente a los animales entrenados. Además esta estimulación motora también produjo una variación asimétrica en la actividad total de la PKC la cual no se observa cuando se comparan los estriados izquierdo vs. derecho o ipsi vs. contralateral de los animales controles. Estos cambios fueron observados 30 minutos después de realizar una única sesión de actividad motora (150 metros en 7 a 11 vueltas/minuto).

Estas variaciones neuroquímicas son similares a las encontradas luego de realizar el TEC, por lo que se puede concluir que el factor de aprendizaje asociativo (ausente en el TPG) no es un factor determinante de los cambios observados sobre este sistema de transducción de señales en el cuerpo estriado. También el TPG mostró una correlación

significativa entre el porcentaje de caída en la fosforilación endógena de la GAP-43 y la velocidad desarrollada por los animales. El TPG también produce a la edad de 30 días cambios permanentes en los niveles de receptores (Ibarra y col, 1995). Esto sugiere fuertemente que las modificaciones en la PKC y en la fosforilación endógena de la GAP-43 podrían mediar los cambios permanentes relacionados con la plasticidad motora. El TPG realizado en ausencia de condicionamiento hídrico genera por lo tanto una estimulación motora voluntaria en el animal ejercitado. Esta es una clara modificación respecto al procedimiento utilizado por Freed y Yamamoto (1985) en el cual los animales están sujetos a una estimulación motora forzada dado que corren detrás de una mamadera inclinada la cual no pueden alcanzar. Por lo tanto el TPG resulta similar, como modelo inductor de cambios plásticos al test de rueda giratoria. En este test el animal es colocado en una rueda sin fin y al moverse sobre el lugar hace girar la misma. Sin embargo cabe señalar que este test no presenta una estimulación motora asimétrica. En el marco del presente trabajo el test de la rueda giratoria resulta apropiado para ampliar el estudio de las variaciones interhemisféricas luego de producir una estimulación motora simétrica. Estudios realizados con la rueda giratoria permitieron demostrar que el ejercicio físico aumenta los niveles de mensajeros para BDNF y NGF en hipocampo (Neeper y col, 1995, 1996). Estos cambios son indicadores de la presencia de mecanismos plásticos desencadenados por la actividad motora funcional.

2.2. Inversión de los cambios neuroquímicos asimétricos. Evidencias de una regulación interhemisférica de tipo plástica.

Con el objeto de evaluar la cinética de la fosforilación endógena de GAP-43 las ratas fueron sacrificadas a los 0, 30, 45, 60 y 75 minutos después de finalizada la estimulación motora circular. Este estudio demuestra la característica plástica de estos cambios neuroquímicos ya que animales sacrificados inmediatamente después de finalizar la actividad motora (0 minuto) no muestran una modificación significativa en la fosforilación *in vitro* de esta proteína. Por lo tanto estas variaciones están relacionadas con modificaciones neuroquímicas modulatorias, las cuales se disparan una vez completada la actividad motora y no durante la estimulación motora *per se*.

La cinética también permitió observar que la respuesta es dinámica, asimétrica y está caracterizada por una disminución y un “rebote” en la fosforilación endógena de la GAP-43.

Estudios recientes demostraron la existencia de mecanismos moduladores en las sinapsis inhibitorias los cuales tienen la capacidad de generar nuevas formas de LTP y LTD. Estas nuevas formas de plasticidad se caracterizan por presentar una respuesta sináptica con “rebote” en vías neuronales moduladas por sinapsis inhibitorias gabaérgicas. Trabajos realizados por Komatsu e Iwakiri demuestran la participación de mecanismos de LTP y LTD en las sinapsis inhibitorias de la corteza visual. La modulación es consecuencia de la actividad de los elementos pre y/o postsinapticos. La modulación sináptica se produce por una supresión de las corrientes inhibitorias postsinápticas inducidas por despolarización y aumento de la concentración de Ca^{++} en la neurona postsináptica. En el hipocampo y cerebelo, esta inhibición transiente de la eficacia sináptica puede involucrar un mensaje retrógrado dependiente de Ca^{++} (Figura 26).

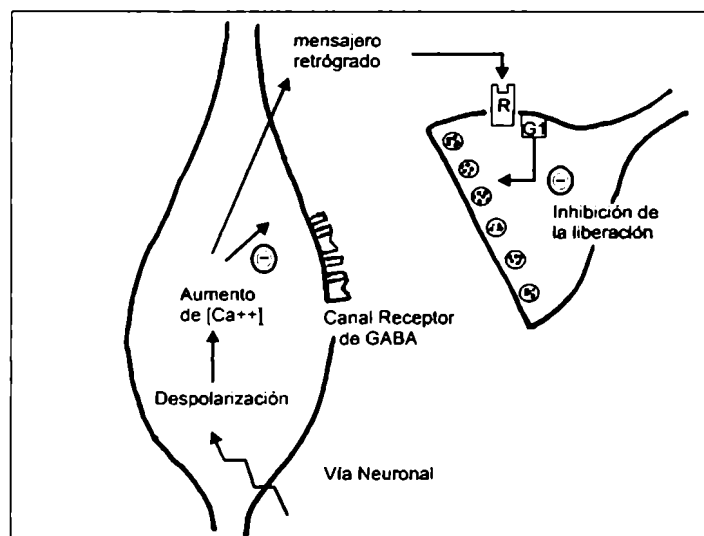


Figura 26: Modelo teórico propuesto para explicar la supresión de la inhibición inducida por despolarización y potenciación por rebote en neuronas del hipocampo y cerebelo moduladas por GABA.

Estos mecanismos moduladores de las sinápsis inhibitorias ocurren más fuertemente en animales en desarrollo que en animales adultos (Komatsu, 1994). Si bien este tipo de modulación aún no fue descrita en el estriado, la alta proporción de sinápsis inhibitorias, la existencia de mensajes retrógrados (Lin y col, 1995) y las evidencias aquí presentadas sugieren que estos mecanismos plásticos podrían desarrollarse en esta estructura cerebral. La modulación por acetil-colina y por agonistas del receptor μ de opiáceos también participan en estos procesos (Marty y Llano, 1995). Debido a que las sinápsis inhibitorias no generan un potencial de acción postsináptico que por sí mismo pueda ser usado como una señal neuroquímica plástica, este tipo de sinápsis no sería el sitio donde ocurren las modificaciones Hebbianas o antihebbianas. Esto es una característica importante que no excluye la posibilidad de que el TEC produzca cambios plásticos en fibras dopaminérgicas y colinérgicas. Por lo tanto estas vías, influenciadas por GABA, deberían ser las que modulen a las vías inhibitorias y permitirían generar la potenciación por “rebote”.

Evidencias evolutivas para la existencia de redes neuronales caracterizadas por inhibición recíproca y rebote post-inhibitorio fueron descritas en el molusco Clione limacina, en estos organismos estos circuitos participan en la generación de un patrón locomotor relacionado con el nado. El circuito neuronal consiste de dos grupos de interneuronas de función antagónica que despliegan un fuerte rebote post-inhibitorio y que están unidas por conexiones inhibitorias recíprocas. Este circuito controla un comportamiento que consiste de dos fases relativamente simétricas. Esta es una evidencia para la existencia de un comportamiento locomotor de dos fases como el observado a través de los mecanismos plásticos de fosforilación de GAP-43.

Por otra parte la inversión observada a lo largo de la cinética en la fosforilación endógena de la GAP-43 evidencian una regulación interhemisférica de tipo plástica. Los cambios observados en la capacidad de unión a sitios mAChR y en la actividad de PKC también evidencian la participación de mecanismos regulatorios interestriatales. Al respecto estudios previos de una regulación interhemisférica fueron observados para la inervación dopaminérgicas de ambos estriados e hipocampos en ratas normales no lesionadas. Estos trabajos describen una relación inversa entre el índice interhemisférico

de DA y el índice interhemisférico del recambio presináptico de DA (DOPAC/DA). Este mecanismo permitiría compensar asimetrías interhemisféricas espontáneas (Rodríguez y col, 1990). De la misma manera esta plasticidad asimétrica desfasada en el tiempo evidencia la participación de procesos regulatorios interestriatales que permitirían compensar las asimetrías neuroquímicas detectadas luego del comportamiento motor circular. Esto concuerda con el hecho de que durante una administración unilateral de 6OH-dopamina (inductora de daños en neuronas nigroestriatales) los animales muestran preferencias de lateralidad caracterizadas por un intenso comportamiento rotacional. Este ejemplo representa un caso patológico en el cual se anula la regulación interhemisférica compensatoria debido a la lesión unilateral de la vía nigroestriatal.

Glick y colaboradores demostraron que la administración de apomorfina produce una dirección preferencial de giro. Esta dirección preferida de rotación es contralateral al estriado con mayor contenido de dopamina y mayor actividad metabólica (Glick y col, 1976). Actualmente existen evidencias que permiten suponer que el desbalance estriatal en la captación de DA produce un comportamiento asimétrico durante la rotación espontánea. La destrucción de las neuronas GABAérgicas en la sustancia nigra también participan en la generación de comportamientos rotacionales intensos y de larga duración. Estas interferencias en el sistema GABAérgico afectan al comportamiento motor, confirmando la importancia de este sistema inhibitorio en la modulación de la función motora.

Asimetrías en el número de sitios de unión para GABA y a receptores dopaminérgicos D2 fueron detectados en estriado de rata (Glick y col, 1988; Guarneri y col, 1988).

La dominancia presináptica observada en el sistema dopaminérgico contralateral a la preferencia espacial del comportamiento permitirían relacionar los cambios asimétricos observados en la fosforilación endógena de la GAP-43 con modulación presináptica de vías dopaminérgicas nigroestriatales. Sin embargo la fuerte interacción funcional colinérgico-dopaminérgica (Coyle y Campochiaro, 1976; Di Chiara y col, 1994) permiten hipotetizar que los cambios observados en la fosforilación endógena de la GAP-43 podrían relacionarse también con los terminales colinérgicos. Precisamente los receptores mACh y dopaminérgicos D1 y D2 son modificados en forma permanente luego de realizar una estimulación motora circular durante un período crítico del desarrollo estriatal.

A largo plazo este tipo de comportamiento motor no modificó asimétricamente a los mAChR (Ibarra y col,1995). Un punto conflictivo para relacionar estos cambios neuroquímicos de corto plazo con los cambios permanentes en los mAChR radica en el hecho de que los cambios de largo plazo no son asimétricos. Sin embargo la inversión observada a corto plazo en la fosforilación de GAP-43, en la actividad de PKC y en la capacidad de unión a sitios muscarínicos revelan la complejidad de secuencias de eventos celulares y/o circuitales involucrados en la respuesta plástica dependiente de la actividad y permiten hipotetizar sobre la falta de bilateralidad detectada en los cambios permanentes.

Es necesario aclarar que los cambios de corto plazo observados en la capacidad de unión a sitios muscarínicos fueron determinados sólo en condiciones de subsaturación, por lo tanto los cambios estarían relacionados con una variación en la afinidad del receptor más que con un cambio en el número total de sitios de unión.

CONCLUSIONES

A partir de este trabajo pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- 1) Se demuestra que, en el estriado de rata, la fosforilación de la proteína GAP-43/ B-50 mediada por PKC puede ser modificada en forma plástica por la actividad fisiológica..
- 2) Esta participación plástica de la GAP-43 ocurre a través de un cambio en su estado de fosforilación en el residuo Ser-41 (sitio específico de PKC)
- 3) Se demuestra la participación de la PKC y de su sustrato neuronal GAP-43/B-50 en los mecanismos plásticos dependientes de la actividad motora durante un período crítico del desarrollo postnatal del estriado de rata. Esto confirma que marcadores generales de plasticidad neuronal participan durante el periodo crítico en el cual se generan cambios permanentes de neuroreceptores.
- 4) La inversión de los cambios neuroquímicos asimétricos es la primera evidencia de una regulación interhemisférica de tipo plástica.

REFERENCIAS

- Abbadie, Honoré P, Besson JM. Intense cold noxious stimulation of the rat hindpaw induces c-fos expression in lumbar spinal cord neurons. **Neurosci.** 59: 457-468 (1994).
- Akers RF., Lovinger DM., Colley PA., Linden DJ y Routtenberg A. translocation of PKC activity may mediate hippocampal long-term potentiation. **Science** 231, 587-589 (1986)
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends Neurosci.** 12: 366-375 (1989).
- Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. **Neuron** 5: 297-306 (1990).
- Alexander KA., Lovinger DM., Colley PA. y Routtenberg A. Regulation of calmodulin-binding to P-57. **J. Biol. Chem** 262, 6108-6113 (1987).
- Alexander KA., Wakim BT., Doyle GS., Walsh KA. y Storm DR. Identification and characterization of the calmodulin binding domain of neuromodulin, a neurospecific calmodulin binding protein. **J. Biol. Chem.** 263, 7544-7549 (1988).
- Aloyo YJ., Zwiers H., Gispen WH. Phosphorylation of B-50 by calcium-activated, phospholipid dependent protein kinase and B-50 protein kinase. **J. Neurochem.** 41, 649-653 (1983).
- Ambalavanar R, Van Der Zee EA., Bolhuis JJ., Mc Cabe BJ. y Horn G. Co-expression of fos immunoreactivity in PKC γ positive neurones : quantitative analyses of a brain region involved in learning. **Brain Res.** 606, 315-318 (1993).
- Angel P., Imagawa M., Chui R., Stein B., Imbra RJ, Rahmsdorf HJ., Jonart C., Herrlich P., Karin M. Phorbol-ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. **Cell** 49, 729-739 (1987)
- Angrist B., Sathananthan G., Wilk S. y Gershon S. Amphetamine psychosis: behavioral and biochemical aspects. **J. Psychiat. Res.** 11, 13-23 (1974).

- Aosaki T, Graybiel AM, Kimura M. Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural response in the striatum of behaving monkeys. **Science** 265: 412-415 (1994).
- Apel ED., Litchfield WD., Clark RH., Krebs EG., Storm DR. Phosphorylation of neuromodulin (GAP-43) by casein kinase II: identification of phosphorylation sites and regulation by calmodulin. **J. Biol. Chem.** 266, 10544-10551 (1991).
- Azcurra JM. y De Robertis E. Binding of kimethyl-C14-d-Tubocurarine, methyl-C14-Hexamethonium and H3-allopherine by isolated synaptic membranes of brain cortex. **Int. J. Neuropharmacol.** 6, 15-26 (1967).
- Bacher N., Zismann Y., Berent E. y Livneh E. Isolation and characterization of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin and heart. **Mol. Cel. Biol.** 11, 126-133 (1991)
- Bar PR., Tielen AM., Lópes Da Silva FH., Zwiers H. y gispén WH. Membrane phosphoproteins of rat hippocampus: Sensitivity to tetanic stimulation and enkephalin. **Brain Res.** 321, 381-385 (1982)
- Baudier J., Bronner C. y Cole RD. protein kinase C substrates from rat brain: purification and characterization of neuromodulin, a neuron-specific calmodulin binding protein. **J. Biol. Chem.** 264, 1824-1828 (1989)
- Bell RM. y Bums DJ., Lipid activation of protein kinase C (PKC). **J. Biol. Chem.** 266, 4661-4664 (1991)
- Benes FM., Paskevich PA., Davidson J. y Domesick VB. The effects of haloperidol on synaptic patterns in the rat striatum. **Brain Res.** 329, 265-274 (1985).
- Benowitz LI. y Routtenberg A. A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity. **Trends Neurosci.** 10, 527-532 (1987).
- Benowitz LI., Apostolides PJ., Perrone-Bizzozero NI., Finklestein SP. y Zwiers H. Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain **J.Neurosci.** 8, 339-352 (1988).
- Bernabeu RO. Adquisición y consolidación de una memoria: Posibles cambios en la actividad de sistemas enzimáticos neuronales en el hipocampo de rata. trabajo de Tesis (1996).

- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. **Biochem. J.** 220, 345-360 (1984).
- Bliss TVP. y Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long term potentiation in the hippocampus. **Nature** 361, 31-39 (1993)
- Blomquist KB, Danner F. Effects of physical conditioning on information-processing efficiency. **Percept. Mot. Skills** 65: 175-186 (1987).
- Brusés JL, Berninsone PM, Ojea SI, Azcurra JM. The circling training rat model as a behavioral teratology test. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 38: 739-745 (1991).
- Brusés JL y Azcurra JM. The circling training: A behavioral paradigm for functional teratology testing. PM Conn (Ed) Paradigms of the study of behavior. **Methods in Neurosci.** 14: 166-179 (1993).
- Calabresi P., Maj R., Pisani A., Mercuri NB. y Bernardi G. Long-term synaptic depression in the striatum: Physiological and pharmacological characterization. **J. Neurosci.** 12 (11), 4224-4233 (1992).
- Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia - implication for schizophrenia and Parkinson's disease. **Trends Neurosci.** 13: 272-276 (1990).
- Castellano MA., Díaz Palarea MD., Rodríguez M., Barroso J. lateralization in male rats and dopaminergic system: Evidence of right-side population bias. **Physiol. Behav.** 40 (5), 607-612 (1987).
- Clarkson-Smith L, Hartley AA. Relationships between physical exercise and cognitive abilities in older adults. **Psychol. Aging** 4: 183-189 (1989).
- Cochran BH, Zullo J, Verma IM, Stiles CD. Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. **Science** 226: 1080-1082 (1984).
- Cole G., Dobkin KR., Hansen LA., Terry RD. y Saitoh T. decreased levels of PKC in Alzheimer brain. **Brain Res** 453, 165-174 (1988).
- Cotman CN, Sampedro MN. Cell biology of synaptic plasticity. **Science** 225:1287-1294, (1984).
- Coyle JT y Campochiaro P. Ontogenesis of dopaminergic-Cholinergic interactions in the rat striatum: A neurochemical study. **J. Neurochem.** 27, 673-678 (1976).

- Cowan WM, Fawcett JA, O'Leary DDM, Stanfield BB. Regressive events in neurogenesis. **Science** 225: 1258-1265 (1984).
- Crair M.C. y Malenka R.C. A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. **Nature** 375, 325-328 (1995).
- Chapman ER., Au D., Alexander KA., Nicolson TA. y Storm DR. Characterization of the calmodulin binding domain of neuromodulin-functional significance of Serine 41 and Phenylalanine 42. **J. Biol. Chem.** 266, 207-213 (1991).
- Chen JF., Qin ZH., Szele F., Bai G. y Weiss B. Neuronal localization and modulation of the D2 dopamine receptor mRNA in brain of normal mice and mice lesioned with 6OH-dopamine. **Neuropharmacol.** 30, 927-941 (1991).
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem** 162: 156-159 (1987).
- Christie JE, Crow Tj. Turning behavior as an index of the action of amphetamines and ephedrine on central dopamine-containing neurones. **Br. J. Pharmacol.** 43: 658-667 (1971)
- Colley PA. y Routtenberg A. Long-term potentiation as synaptic dialogue. **Brain Res. Rev.** 18, 115-122 (1993).
- Conway RG, Routtenberg A. Endogenous phosphorylation in vitro: selective effects of sacrifice methods on specific brain proteins. **Brain Res.** 139, 366-373 (1978)
- Côté L. y Crutcher MD. The basal ganglia. In: **Principles of Neural Science**. Ed. Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM. Elseiver, New York 647-659 (1991).
- Curran T, Morgan JI. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. **Science** 229: 1265-1268 (1985).
- Da Cunha A., Aloyo VJ. y Vitkovic L. Developmental Regulation of GAP-43: Glutamine synthetase and beta-actin messenger TNA in rat cortical astrocytes. **Dev. Brain Res.** 64, 212-215 (1991).
- Dass GD y Altman J. Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat. **Brain Res.** 122-127 (1970).
- De Graan PNE, Oestreicher AB., De Wit M., Kroef M., Schrama LH. y gispens WH. Evidence for the binding of calmodulin to endogenous B-50 (GAP-43) in native synaptosomal plasma membranes. **J. Neurochem.** 55:2139-2141 (1990)

- Dekker LB., De Graan PNE., Versteeg DHG, Oestreicher AB y Gispén WH., Phosphorylation of B-50 (GAP-43) is correlated with neurotransmitter release in rat hippocampal slices **J. Neurochem.** 52, 24-30 (1989a).
- Dekker LB., De Graan PNE., Oestreicher AB., Versteeg DHG. y Gispén WH. Inhibition of noradrenaline release by antibodies to B-50 (GAP-43). **Nature** 342, 74-76 (1989 b).
- Dekker LB., De Graan PNE. y Gispén WH. Transmitter release: target of regulation by protein kinase C. **Prog. Brain. Res.** 46, 209-233 (1991).
- Deloulme JC., Janet T., Storm DR., Sensenbrenner M. y Baudier J. Neuromodulin (GAP-43) gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system. **Dev. Brain Res.** 46, 161-168 (1990).
- Dent EW. y Meiri KF. GAP-43 phosphorylation is dynamically regulated in individual growth cones. **J. Neurobiol.** 23, 1037-1053 (1992).
- Diamond J, Holmes M, Coughlin M. Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. **J. Neurosci.** 12: 1454-1466, (1992).
- Diana M, Garcia-Muñoz M, Richards J, Freed CR. Electrophysiological analysis of dopamine cells from the substantia nigra pars compacta of circling rats. **Exp. Brain. Res.** 74: 625-630 (1989).
- DiChiara G, Morelli M, Consolo S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum. Ach/dopamine/NMDA interactions. **Trends Neurosci.** 17: 228-233 (1994)
- Di Figlia M, Pasik P, Pasik T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. **Brain Res.** 114: 245-256, 1976.
- Di Luca M., Cimino M., de Graan PME., Oestreicher AB., Gispén WH. y Cattabeni F. Microencephaly reduces the phosphorylation of the PKC substrate B-50/GAP-43 in rat cortex and hippocampus. **Brain Res.** 538, 95-101 (1991).
- Dokas LA., Písono MR., Schrama LH., Zwiers H. y Gispén WH. Dephosphorylation of B-50 in synaptic plasma membranes. **Brain Res. Bull.** 24, 321-329 (1990)
- Dragunou M., Robertson GS., Faull RLM., Robertson HA. Jansen K. D2 dopamine receptor antagonists induce fos and related proteins in rat striatal neurons. **Neurosci.** 37, 287-294 (1990)
- Dumbledam J. In: **Neural and behavioral plasticity, the avian and mammalian forebrain:**

Correspondence and differences (Ed. Andrew R.) 65-91. Oxford University Press, Oxford (1991).

- Dudek SM. y Bear MF. A biochemical correlate of the critic period for synaptic modifications in the visual cortex . **Science** 240, 673-675 (1989).
- Dustman RE, Emmerson RY, Ruhling RO, Shearer DE. Steinhaus LA, Johnson SC, Bonekat HW, Shigeoka JW. Age and fitness effects on EEG, ERPs, visual sensitivity and cognition. **Neurobiol. Aging** 11: 193-200, (1990).
- Ehrlich YH., Rabjohns RR. y Routtemberg A. Experimental input alters the phosphorylation of specific proteins in brain membranes. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 6, 169-174 (1977)
- El-Fakahany EE, Alger BE, Lai WS, Pitler TA, Worley PF, Baraban JM. Neuronal muscarinic responses: role of protein kinase C. **FASEB J** 2:2575-2583 (1988).
- Emmerson RY, Dustman RE, Shearer DE, Turner CW. P3 latency and symbol digit performance correlations in aging. **Exp. Aging Res.** 15: 151-159, (1989).
- Fordyce D.E. y Farrar RP. Physical activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial learning in F344 rats. **Behav. Brain Res.** 43: 115-123, (1991).
- Fordyce DE, Starnes JW, Farrar RP. Compensation of the age-related decline in hippocampal muscarinic receptor density through daily exercise or underfeeding. **J. Gerontol.** 46: 245-248, (1991).
- Franck E. The influence of neuronal activity on patterns of synaptic connections. **Trends Neurosci.**10:188-190 (1987).
- Gerendasy DD., Herron SR., Jennings PA. y Sutcliffe GG. Calmodulin stabilizes an amphiphilic alpha-helix within RC3-neurogranin and GAP-43/neuromodulin only when Ca⁺⁺ is absent. **J. Biol. Chem.** 270. 6741-6750 (1995)
- Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. **Ann. Rev. Neurosci.** 15: 285-320, 1992 a.
- Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. **Trends Neurosci.** 15: 133-139, 1992b.
- Geyer MA. Approaches to the characterization of drug effects on locomotor activity in rodents. In: **Testing and evaluation of drugs of abuse.** Modern methods in Pharmacology Vol 6: 81-99, 1990. Wiley-Liss, Inc.

- Ghirardi M, Brama O., Hochner B., Montarolo PG., Kandel ER. y Dale N. Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitted release at depressed and non-depressed synapses in aplysia sensory neurons. **Neuron** 9, 479-489 (1992).
- Gianotti C., Nunzi MG., Gispén WH y Corradetti R. Phosphorylation of the presynaptic protein B-50 (GAP-43) is increased during electrically induced long-term potentiation. **Neuron** 8, 843-848 (1992).
- Gilliam PE, Spirduso WW, Martin TP, Walters TJ, Wilcox RE, Farrar RP. The effects of exercise training on 3H-Spiperone binding in rat striatum. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 20: 863-867 (1984).
- Girault JA., Hemmings HC.Jr., Williams KR., Nairn AC., y Greengard P. Phosphorylation of DARP-32, a dopamine and cAMP-regulated Phosphoprotein, by casein kinase II. **J. Biol. Chem.** 264,21748-21759 (1989).
- Girault JA. Protein Phosphorylation and dephosphorylation in the mammalian central nervous system. **Neurochem. Int.** 23 (1), 1-25 (1993)
- Gispén WH., Nielander HB., De Graan PN., Oestreicher AB., Schrama LH. y Schotman P. Role of the growth-associated protein B-50/GAP-53 in neuronal plasticity. **Mol. Neurobiol.** 5, 61-85 (1991).
- Gleser J, Mendelberg H. Exercise and sport in mental health: a review of literature. **Isr J. Psychiatry. Relat. Sci.** 27: 99-112, (1990).
- Glick SD, Jerussi TP, Fleisher LN. Turning in circles: the neuropharmacology of rotation. **Life Sci.** 18: 889-896 (1976).
- Glick SD, Lyon RA, Hinds PA, Soweck C, Titeler M. Correlated asymmetries in striatal D1 and D2 binding: relationship to apomorphine-induced rotation. **Brain Res** 455:43-48 (1988).
- Gnegy ME., Hong P y Ferrel ST. Phosphorylation of neuromodulin in rat striatum after acute and repeated, intermittent amphetamine. **Mol. Brain Res.** 20, 289-298 (1993).
- Gómez MI., Medrano EE., Caferata EGA y Téllez Iñón MT. Protein kinase C is differentially regulated by thrombin, insulin and epidermal growth factor in human mammary tumor cells. **Exp. Cell Res** 175, 74-80 (1988).
- Goodman C.S. y Shatz C. J. Developmental mechanism that generate precise patterns of neuronal connectivity. **Cell** 72/**Neuron** 10 (Suppl.), 77-98 (1993)

- Gordon AS., Davis CG. y Diamond I. Phosphorylation of membrane proteins at a cholinergic synapse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74, 263-267 (1977).
- Gordon I., Rehavi M. y Mintz M. Bilateral imbalance in striatal DA-uptake controls rotation behavior. **Brain Res.** 646 (2), 207-210 (1994).
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87: 6912-6916, (1990).
- Graybiel AM. The basal ganglia. **Trends Neurosci.** 18: 60-62 (1995)
- Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. **Science** 234: 80-83 (1986).
- Greengard P. Cyclic nucleotides, phosphorilated proteins and the nervous system. **Fed. Proc.** 38, 2208-2217 (1979)
- Guarneri P., Guarneri R., Labella V., Scondottos , Scoppa F., Piccoli F. Lateral differences in GABA binding sites in rat brain. **Neurochem. Res.** 13 (3), 209-211 (1988)
- Hanks SK., Quinn AM y Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science** 241, 42-52 (1988).
- Hens JJH., Ghijsen WEJM., Dimjati W., Wiegant VM., Oestreicher AB., Gispen WH y De Graan PNE. evidence for a role of protein kinase C substrate B-50 (GAP-43) in Ca²⁺-induced neuropeptide cholecystinin-8 release from permeated synaptosomes. **J. Neurochem.** 61, 602-609 (1993a)
- Hens JJH., De Wit M., Dekker LV., Boomsma F., Oestreicher AB., Margolis F., Gispen WH. y De Graan PNE. Studies on the role of B-50 (GAP-43) in the mechanism of Ca²⁺ induced noradrenaline release: Lack of involvement of protein kinase C after the Ca²⁺ trigger. **J. Neurochem.** 60, 1264-1263. (1993b)
- Heyman GM y Beer B. A new approach for evaluating the behavioral effects of antipsychotics drugs. **TIPS** 8, 388-393, 1987.
- Hsu L. Neurite-promoting effects of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on chick embryo neurons. **Neurosci. Lett.** 62, 183-189 (1985).
- Huang KP., Nakabayashi H. y Huang FL. Isozymic forms of rat brain calcium-activated and phospholipid dependent protein kinase. **PNAS USA** 84, 8535-8539 (1986).

- Huganir RL. y Greengard P. Regulation of receptor function by protein phosphorylation. **Trends Pharmacol. Sci.** 8, 472-477 (1987).
- Hulme E, Birdsall N., Buckley J. Muscarinic receptor subtypes. **Annu. Rev. Pharmacol.** 30, 633-673 (1990)
- Hunter A. y Stewart MG. Long term increases in the numerical density of synapses in the chick lobus parolfactorius after passive avoidance training. **Brain Res.** 605, 251-255 (1993).
- Hunter T. y Safton H. Protein Phosphorylation. Part A Protein kinases, assays purification, antibodies, functional analysis, cloning and expression Protein kinase classification. **Meth. Enzym.** 200, 3-7 (1991).
- Hydén H., Cupello A. y Palm A. Increased binding of GABA to its postsynaptic carrier sites on the plasma membranes of Deiter's neurons after a learning experiment in rats. **Brain Res.** 294, 37-45 (1984)
- Ibarra GR., Rodríguez JA., Paratcha G Ch. y Azcurra JM. Permanent alteration of muscarinic acetylcholine receptor binding in rat striatum after circling training during development. **Brain Res.** 705, 39-44 (1995).
- Ibarra GR, Paratcha G Ch., Wolansky MJ. y Azcurra JM. Co-alteration of dopamine D2 receptro and muscarinic acetylcholine receptor binding in rat striatum after circling training **Neuroreport** 7, 2491-2494 (1996).
- Ibarra GR., Estudio de la interrelación colinérgico-dopaminérgica en el estriado de rata durante un período crítico del desarrollo: Un modelo de plasticidad sináptica. (1997).
- Jacobson M (Ed). Developmental neurobiology. 2nd edition. Plenum Press, New York (1978).
- Janowsky DS. y Risch C. Amphetamine psychosis and psychotic syptoms. **Psychopharmacology** 65, 73-77 (1979).
- Kaczmarek LK. The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter release. **Trends Neurosci.** 10, 30-34 (1987).
- Kano M., Rexhausen U., Dreessen J., Konnerth A. Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** 12, 4122-4132 (1992).

- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. **Trends Neurosci.** 18: 527-535, 1995.
- Kemel ML., Gauchy C., Glowinsky J. y Besson MJ. In vivo release of [3H]GABA in cat caudate nucleus and substantia nigra. II. Involvement of different thalamic nuclei in the bilateral changes induced by a nigral application of muscimol. **Brain Res.**, 203-213 (1984)
- Kerns JM., Sierem DK., Kao LC., Klawans HL y Carvey PM. Synaptic plasticity in the rat striatum following chronic haloperidol treatment. **Clin. Neuropharmacol.** 15, 488-500 (1992).
- Kitano T., Go M., Kikkawa V. y Nishizuka Y. Assay and purification of protein kinase C. **Methods in Enzymol.** 124, 349-352 (1986).
- Kirkwood A., Hey-Kyoung L. y Bear M.F. Co-regulation of long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity in visual cortex by age and experientia. **Nature** 35, 328-331 (1995).
- Klitzova AJ., Haselhorst U., Uranova NA., Schenk H. y Istomin VV. The effects of haloperidol on synaptic plasticity in rat's medial prefrontal cortex. **J. Hirnforsch** 30, 51-57 (1989)
- Klitzova AJ., Uranova NA., Haselhorst U. y Schenk H. Synaptic plasticity in rat medial prefrontal cortex under chronic haloperidol treatment produced behavioral sensitization. **J. Hirnforsch** 31, 175-179 (1990).
- Klose M y Bentley D. Transient pioneer neurons are essential for formation of an embryonic peripheral nerve. **Science** 245: 982-983 (1989).
- Kohmura E, Takamichi Y. Kazuo Y, Sakaguchi T, Wanaka A, Hayakawa T. c-fos mRNA after cortical ablation in rat brain is modulated by basic fibroblast growth factor (bFGF) and the NMDA Expression of receptor is involved in c-fos expression. **Mol. Brain Res.** 28: 117-121 (1995).
- Komatsu Y. e Iwakiri M. Long-term modification of inhibitory synaptic transmission in developing visual cortex. **Neuroreport** 4, 907-910 (1993).
- Komatsu Y. Age dependent long-term potentiation of inhibitory synaptic transmission in rat visual cortex. **J. Neurosci.** 14, 6488-6499 (1994).
- Konno Y., Ohno S. y Akita Y. Enzymatic properties of a novel phorbol ester protein kinase, nPKC. **J.Biol. Chem.** 106, 673-678 (1989).

- Kristjansson Gl., Zwiers H., Oestreicher AB y Gispen WH. Evidence that the synaptic phosphoprotein B-50 is localized exclusively in nerve tissue. **J. Neurochem.** 39, 371-378 (1982).

Larkman A. y Jack J.J.P. Synaptic plasticity hippocampal: LTP. **Curr. Opin. in Neurobiol.** 5, 324-334 (1995)

- Lauder JM. y Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I- Cell differentiation. **J. Comp. Neurol.** 155, 469-483 (1974).

Lauder JM. y Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons. II- Synaptogenesis. **J.Comp.Neurol.** 163, 251-264 (1975).

Leidenheimer N., Mc.Quilkin S.J., Hamner L.D., Whiting P.y Harris A. Activation of protein kinase C selectively inhibits the γ -aminobutyric acid A receptor: Role of desensitization. **Mol. Pharmacology** 41;1116-1123 (1992)

- Lenn NJ. Neuroplasticity and the developing brain: implications for therapy. **Pediatr Neurosci.** 13: 176-183 (1987).

- Leviel V., Chéramy C. y Glowinsky J. Role of the dendritic released of dopamine in teh reciprocal cotrol of the two nigrostratal dopaminergic pathways. **Nature (Lond)** 280, 236-239 (1979).

- Liles WC, Hunter DD, Meier DE, Nathanson NM. Activation of protein kinase C induces rapid internalization and subsequent degradation of muscarinic acetylcholine receptors in neuroblastoma cells. **J Biol Chem** 261:5307-5313 (1986).

- Lin AMY., Kao LS. y Chai CY. Involvement of nitric oxide in dopaminergic transmission in rat striatum: An in vivo electrochemical study. **J. of Neurochem.** 65, 2043-2049 (1995).

- Lindberg R., Quinn AM. y Hunter T. Dual-specificity protein kinases: While any hydroxyl do?. **Trends Biochem. Sci.** 17,114-119 (1992)

- Liu Y. y Storm DR. Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. **Trends Pharmacol. Sci.** 11, 107-111 (1990).

- Liu J, Nickolenko J, Sharp FR. Morphine induces c-fos and junB in striatum and nucleus accumbens via D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 8537-8541, (1994).

- Lovinger DM., Colley PA., Akers RF y Routtenberg A. Direct relation of long-term synaptic potentiation to phosphorylation of membrane protein F1, a substrate for membrane protein kinase C. **Brain Res.** 399, 205-211 (1986)
- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with follin reagent. **J. Biol. Chem** 193, 265-272 (1951)
- Lupinacci NS, Rikli RE, Jones CJ, Ross D. Age and physical activity effects on reaction time and digit symbol substitution performance in cognitively active adults. **Res Q Exerc Sport** 64: 144-150 (1993).
- Mac Rae PG. Spirduso WW, Walters TJ, Farrar RP, Wilcox RE. Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolites in presenescent older rats. **Psychopharmacol.** 92: 236-240 (1987).
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA y Waxham MN. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in LTP. **Nature.** 340, 554-557, (1989).
- Marais RM. y Parker PJ. purification and characterization of bovine kinase C isotypes α , β and γ . **Eur. J. Biochem.** 182, 129-137 (1989).
- Marty A. y Llano I. Modulation of inhibitory synapses in the mammalian brain. **Curr. Opinion in Neurobiol.** 5 (3), 335-341 (1995).
- Mc Geer PL., Eccles JC. y Mc Geer EG. **Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain.** Plenum Press, New York 233-270 (1978).
- Mc Kinney M. y Kent C. Differential expression of GAP-43 mRNA in adult central cholinergic neuronal populations. **Mol. Brain Res.** 23, 213-220 (1994).
- Meberg PJ., Routtenberg A. Selective expression of protein F1/GAP-43 messenger RNA in pyramidal but not granule cells of the hippocampus. **Neurosci.** 45, 721-733 (1991)
- Medina JH. y Pazo JH. Electrophysiological evidence for the existence of caudate-caudate connections. **Intern. J. Neurosci.** 15, 99-101 (1981)
- Meiri KF y Gordon-Weeks PR. GAP-43 in growth cones is associated with areas of membrane that are tightly bound to substrate and is a component a membrane skeleton subcellular fraction. **J Neurosci.** 10, 256-266 (1990).

- Merchant KM. y Dorsa DM. Differential induction of neurotensin and c-fos gene expression by typical vs. atypical antipsychotics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90, 3447-3451 (1993).
- Mercken M., Lubke U., Vandermeeren, Gheuens J. y Oestreicher AB. Immunocytochemical detection of the growth-associated protein B-50 by newly characterized monoclonal antibodies in human brain and muscle. **J. Neurobiol.** 23, 309-321 (1992).
- Miller JC. Induction of c-fos mRNA expression in rat striatum by neuroleptic drugs. **J. Neurochem.** 54, 1453-1455 (1990).
- Mobley WC., Woo JE., Edwards RH., Riopelle RJ., Longo FM., Weskamp G., Otten U., Valleta JS. y Johnston MV. Developmental regulation of nerve growth factor and its receptor in the rat caudate-putamen. **Neuron** 3, 655-664 (1989).
- Montz HP., Davis GE., Skaper SD., Manthorp M. y Varon S. Tumor promoting phorbol ester mimics two distinct neurotrophic factors. **Brain Res.** 355, 150-154 (1985)
- Moratalla R, Vickers EA, Robertson HA, Cochran BH, Graybiel AM. Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine. **J. Neurosci** 13: 423-433, 1993.
- Morgan DG y Routtenberg A. Evidence that a 41000 Dalton brain phosphoprotein is pyruvate dehydrogenase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 95, 569-576 (1980).
- Morgan ME, Yamamoto BK, Freed CR. Unilateral activation of caudate Tyrosine hydroxylase during voluntary circling behavior. **J. Neurochem** 43: 737- 741 (1984).
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the Central Nervous System after seizure. **Science** 237: 192-197 (1987).
- Nakanishi H. y Exton JH. purification and characterization of the ζ -isoform of protein kinase C from bovine kidney. **J. Biol. Chem.** 267, 16347-16354 (1990)
- Neeper SA. Gómez-Pinilla F., Choi J. y Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. **Nature** 373, 109 (1995)
- Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res.** 726: 49-56 (1996).
- Nelson RB., Linden DJ., Routtenberg A. Phosphoproteins localized to presynaptic terminal linked to persistence of LTP: quantitative analysis of two-dimensional gels. **Brain Res.** 497, 30-42 (1989).
- Nestler EJ y Greengard P. Protein Phosphorylation and deregulation of neuronal function.

Basic Biochemistry. Chapter 22, 449-474 (1994).

- Neve RL., Ivins KJ., Benowitz LI., During MJ. y Geller AI. Molecular analysis of the function of the neuronal growth- associated protein GAP-43 by genetic intervention. **Mol. Neurobiol.** 5, 131-141 (1991).
- Nielander HB., Schrama LH., Van Rozen AJ., Kasperiatis M., Oestreicher AB., Gispen WH. y Schotman P. Mutation of Serine 41 in neuron specific B-50 (GAP-43) prohibits phosphorylation by protein kinase C. **J. Neurochem.** 55, 1442-1445 (1991).
- Nikkhah G, Duan WM, Knappe U, Jodicke A, Bjorklund A. Restoration of complex sensorimotor behavior and skilled forelimb use by a modified nigral cell suspension transplantation approach in the rat Parkinson model. **Neurosci** 56: 33-43 (1993)
- Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. **Science** 223, 305-312 (1986).
- Nishizuka Y. the molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature** (London) 334, 661-665 (1988).
- Nixon RA. y Sihag RK. Neurofilament phosphorylation: A new outlook at regulation and function. **Trends Neurosci.** 14, 501-505 (1991).
- Nonomura T, Hatanaka H. Neurotrophic effect of brain-derived neurotrophic factor on basal forebrain cholinergic neurons in culture from postnatal rats. **Neurosci. Res.** 14: 226-233 (1992).
- Norden JJ, Lettes A, Costello B, Lin L, Wouters B, Bock S y Freeman JA. Possible role for GAP-43 in calcium regulation/ neurotransmitter release. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 627, 557-559 (1994).
- Oestreicher AB., Van Dongen CJ., Zwiers H. y Gispen WH. Affinity-purified anti-B-50 protein antibody: Interference with the function of the phosphoprotein B-50 in synaptic plasma membranes. **J. Neurochem.** 41, 267-279 (1989)
- Ohno S., Konno U., Akita Y., Yano A. y Suzuki K. A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alfa abolishes the kinase activity and renders it down-regulation insensitive. A molecular link between autophosphorylation and down-regulation. **J. Biol. Chem.** 265, 6296-6300 (1990).
- Oestreicher AB. y Gispen WH. Comparison of the immunocytochemical distribution of the phosphoprotein B-50 in the cerebellum and hippocampus of immature and adult rat brain. **Brain Res.** 375, 267-279 (1986).

- Ono Y., Fujii T. y Ogita K. The structure, expression , and properties of additional members of the protein kinase C family. **J. Biol. Chem.** 263, 6927-6932 (1988).
- Ono Y. y Fujii T. Protein kinase C ζ subspecies from rat brain: its structure-expression and properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86, 3099-3103 (1989).
- Osada S., Mizuno K. y Saido TC. A phobol ester receptor /protein kinase, nPKC a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. **J. Biol. Chem.** 265, 22434-22440 (1990)
- Osada S., Misuno K. y Saido TC. A new member of the protein kinase C family predominantly expressed in skeletal muscle. **Mol. Cell. Biol.** 12, 3930-3938 (1992)
- Padmaperuma B., Mark R., Dhillon HS., Mattson MP. y Renuka Prasad M. Alterations in brain protein kinase C after experimental brain injury. **Brain Res.** 714, 19-26 (1996).
- Pardo JV, Cresse Y, Burt DR y Snyder SH. Ontogenesis of dopamine receptor binding in corpus striatum of the rat. **Brain. Res.** 125, 376-382 (1977).
- Parent A. Extrinsic connections of the basal ganglia. **Trends Neurosci** 13: 254-258 (1990).
- Parent A, Hazrati L-N. Functional anatomy of the basal ganglia. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. **Brain Res. Rev.** 20: 91-127 (1995).
- Pasinelli P. Regulation of pre-and postsynaptic protein kinase C (PKC) in hippocampal slices (1996)
- Penney JB. y Young AB. Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. **Ann. Rev. Neurosci.** 6, 73-94 (1983)
- Perez-Navarro E, Alberch J, Marsal J. Postnatal development of functional dopamine opioid and tachykinin receptors that regulate acetylcholine release from rat neostriatal slices. Effect of 6-hydroxydopamine lesion. **Int J Dev. Neurosci** 11: 701-708 (1993).
- Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. **J. Comp. Neurol.** 238: 286-307 (1985).
- Purves D. y Lichtman JW. Elimination of synapses in the developing nervous system. **Science** 210, 153-157 (1980)
- Popov N. y Matthies H. Influence of dopamine receptor agonist and antagonist on calmodulin translocation in different brain regions. **European J. of Pharmacology** 172, 205-210 (1989)

- Pycock CJ. Turning behavior in animals. **Neurosci.** 5, 461-514 (1980).
- Qin Z-H, Chen JF, Weiss B. Lesions of mouse striatum induced by 6-hydroxidopamine differentially alter the density, rate of synthesis and level of gene expression of D1 and D2 dopamine receptors.
- Ramakers GMJ, De Graan PNE, Urban IJA, Kraay D, Tang T, Pasinelli P, Oestreicher AB y Gispens WH. Temporal differences in the phosphorylation state of pre-and postsynaptic protein kinase C substrates B-50/GAP-43 and Neurogranin during LTP. **J. Biol. Chem.** 270, 13892-13898 (1995).
- Reiner A., Brauth S. y Karten H. Evolution of the amniote basal ganglia. **Trends Neurosci.** Sept. 320-325 (1984).
- Richter CP, Wang GH. New apparatus for measuring the spontaneous motility of animals. **J Lab. Clin. Med.** 12: 289-292 (1926).
- Robbins TW, Cador M, Taylor JR, Everitt BJ. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. **Neurosci. Behav. Rev.** 13: 155-162 (1989).
- Robinson TE. y Becker JB. The rotational behavior model: Asymmetry in the effects of unilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra in rats. **Brain Res.** 264, 127-131 (1983)
- Rodier PM.. Structural- functional relationship in experimentally induced brain damage. In **Progress in Brain Res.**, Eds Boer GJ y col. Elsevier Amsterdam 73, 335-348 (1988).
- Rodríguez M., Castellano MA. y Palarea MD. Interhemispheric regulation of dopaminergic ascending systems. **Life Sci.** 47 (5), 377-384 (1990)
- Rogers RI, Meyer JS, Mortel KF. After reaching retirement age physical activity sustains cerebral perfusion and cognition. **J. Am. Geriatr. Soc.** 38: 123-128 (1990).
- Ronald G., Thomas G. Marban E. y O'rourke B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92, 6269-6273 (1995)
- Roberts DCS. Neural substrates mediating cocaine reinforcement; the role of monoamine systems. **Pharmacol. Physiol. and Clinical studies.** 73-90 (1992).
- Roberts R. y Difiglia M. Evidence for synaptic proliferation , reorganization and growth in the excitotoxic lesioned adult rat caudate nucleus. **Exp. Neurol.** 107, 1-10 (1990).
- Robbins TW, Everitt BJ. Neurobehavioral mechanisms of reward and motivation. **Curr. Op. Neurobiol.** 6: 228-236 (1996).

- Rodier PM. Structural-functional relationship in experimentally induced brain damage. In: **Progress in Brain Res.** Eds Boer GJ y col. Elsevier. Amsterdam 73, 335-348 (1988)
- Ross A., Rapuano M. y Prives J. induction of Phosphorylation and cell surface redistribution of acetylcholine receptors by phorbol esters and carbamylcholine in cultured chick muscle cells. **J. Cell Biol.** 107, 1139-1145 (1988)
- Sabol KE., Richards JB. y Freed CR. In vivo dialysis measurement of dopamine and DOPAC in rats trained to turn on a circular treadmill. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 36, 21-28 (1990)
- Sagar S, Sharp FR. y Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science** 240, 1328-1331 (1988).
- Saito N., Kikawa U., Nishizuka Y. y Tanaka C. Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain. **J. Neurosci.** 8,369-382 (1988).
- Saito N., Itouji A. y Totani Y. Cellular and intracellular localization of ϵ -subspecies of protein kinase c in the rat brain; presynaptic localization of ϵ -subspecies. **Brain Res.** 609, 241-248 (1993).
- Saito N. Immunocytochemical localization of PKC subspecies in the hippocampus, In: **Protein kinase C in the CNS focus on neuronal plasticity.** Edited by Canonico PL et al, pp 10-15, Masson, Milano (1994)
- Sarnat BH. y Netsky. **Evolución del sistema nervioso.** Gráficas oviedo, España 344-354 (1976).
- Sato M. Acute exacerbation of methamphetamine psychosis and lasting dopaminergic supersensitivity a clinical survey. **Psychopharmacology Bull.** 22, 750-756 (1986).
- Satterlie RA. Reciprocal inhibition and postinhibitory rebound produce reverberation in a locomotor pattern generator. **Science** 229, 402-404 (1985)
- Sauer H, Fischer W, Nikkhah G, Wiegand SJ, Brundin P, Lindsay RM, Bjorklund A. Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. **Brain Res.** 626: 37-44 (1993).
- Scatton B. y Lehmann J. N-Methyl-D-Aspartate-type receptors mediate striatal ^3H -Acetylcholine release evoked by excitatory aminoacids. **Nature** 297, 422-424 (1982).
- Schneider LH., Murphy RB., Coons EE. Lateralization of striatal dopamine (D2) receptors in normal rats. **Neurosci. Lett.** 33 (3), 281-284 (1982)

- Schulz W, Apicella P, Ljunberg T. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. **J. Neurosci.** 13: 900-913, (1993).
- Schrama LH., De Graan PNE., Oestreicher AB y Gispén WH. B-50 Phosphorylation, protein kinase C and the induction of excessive grooming behavior in the rat. In: **Molecular mechanism of neuronal responsiveness**. Edited by Ehrlich YH. et al, pp:393-408. Plenum Press New York. (1987).
- Schrama LH., Heemskerk FMJ. y de Graan PNE., Dephosphorylation of protein kinase C-Phosphorylated B-50/GAP-43 by the calmodulin dependent phosphatase calcineurin. **Neurosci. Res. Commun.** 5, 141-147 (1989)
- Schrama LH, Eggen BJL., De Graan PNE, Oestreicher AB., Schotman P. y Gispén WH. The neuronal PKC substrate B-50/GAP-43 in plasticity. In: Protein kinase C in the CNS focus on neuronal plasticity, pp: 17-29. Ed Canonico. Mason, Milano (1994)
- Schulman H. The multifunctional Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinases. **Curr. Opinion in Cell Biol** 5, 247-253 (1993).
- Schwarting R. y Huston JP. , Dopamine and serotonin metabolism in brain sites ipsi and contralateral to direction of conditioned turning in rats. **J. Neurochem.** 48, 1473-1479 (1987).
- Segal DS., Weinberger SB., Cahill J. y Mc. Cunney SJ. Multiple daily amphetamine administration: behavioral and neurochemical alterations. **Science** 207, 904-907 (1980).
- Seitz RJ., Roland PE., Böhm, Greitz T. y Stone-Elanders S. Motor learning in man: A positron emission tomographic study. **Neuroreport** 1 (sampler), 17-20 (1990).
- Seki K., Chen HC. y Huang KP. Dephosphorylation of protein kinase C substrate, neurogranin, neuromodulin, and MARCKS by calcineurin and protein phosphatases 1 and 2A. **Arch. Biochem. Biophys.** 316,673-679 (1995).
- Shearmann MS., Naor Z., Sekiguchi K., Kishimoto A. y Nishizuka Y. Selective activation of the δ -subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. **FEBS Lett.** 243, 177-182 (1989).
- Shearmann MS., Shinomura T., Oda T. y Nishizuka Y. Synaptosomal protein kinase C subspecies: A dynamic change in the hippocampus and cerebellar cortex concomitant with synaptogenesis. **J. Neurochem.** 56, 1565-1572 (1991).

- Sheu FS., Mc Cabe BJ., Horn G y Routtenberg A. Learning selectively increases PKC substrate phosphorylation in specific regions of the chick brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90, 2705-2709 (1993).
- Singer W. Development and plasticity of cortical processing architecture. **Science** 270, 758-763 (1995).
- Sivam SP, Krause JE, Breese GR, Hong JS. Dopamine-dependent postnatal development of enkephalin and tachykinin neurons of rat basal ganglia. **J Neurochem** 56:1499-1508, 1991.
- Snyder SH. Amphetamine psychosis: A model schizophrenia mediated by catecholamines. **Am. J. Psychiatry** 130, 61-67 (1973).
- Souza DO., Elizabetsky E. e Izquierdo Y. Effect of various form of training and stimulation on the incorporation of ³²P into nuclear phosphoproteins of rat brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 12,481-486 (1980)
- Spencer SA., Schuh SM., Liu WS. y Willard MB. GAP-43, a protein associated with axon growth, is phosphorylated at three sites in cultured neurons and rat brain. **J. Biol. Chem.** 267 (13), 9059-9064 (1992).
- Spencer SA. y Willard MB. Does GAP-43 support axon growth by increasing the axonal transport velocity of calmodulin? **Exp Neurol.** 115, 167-172 (1992)
- Stewart MG.,Kabai E., Harrison E., Steele RJ., Kossut M., Gierdalski M., Csillag A. The involvement of dopamine in the striatum in passive avoidance training in the chick. **Neurosci.** 70, 7-14 (1996).
- Strittmatter SM., Valenzuela D., Kennedy TE., Neer EJ., Fishmann MC. G₀ is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. **Nature** 344, 836-841 (1990).
- Strittmatter SM., Vartanin T. y Fishmann MC. GAP-43 as a plasticity protein in neuronal form and reparir. **J. Neurobiol.** 23, 507-520, (1992).
- Strosberg AD. Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. **Eur. J. Biochem.** 196, 1-10 (1991).
- Tanaka C. y Saito N. Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. **Neurochem. Int.** 21, 499-512 (1993)
- Tanaka C. Protein kinase C family. In: **Protein kinase C in the CNS focus on neuronal plasticity.** Edited by Canonico PL. et al . pp 3-8, Masson, Milano (1994).

- Tanaka C. y Nishizuka Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. **Ann. Rev. Neurosci.** 17, 551-567 (1994).
- Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science** 270: 593- 598 (1995).
- Tominga M., Kitagawa Y., Tanaka S. y Kishimoto A. Phosphorylation of type II (β) protein kinase C by casein kinase II. **J. Biochem.** 110, 655-660 (1991)
- Towbin H, Staehelin T. y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76, 4350-4354 (1979).
- Ungerstedt U. 6OH-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur. J. Pharmacol.** 5, 107-110 (1968).
- Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6OH-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiol. Scand.(Suppl)** 367, 69-93 (1969).
- Verhaagen J., oestreicher AB., Gispen WH y Margolis FL. The expression of the growth associated protein B-50/ GAP-43 in the olfactory system of neonatal and adult rats **J. Neurosci.** 9, 683-691. (1989).
- Von Voightlander PF, Moore KE. Turning behavior of mice with unilateral 6-hydroxydopamine lesions in the striatum: effects of apomorphine, L-Dopa, amantadine, amphetamine and other psychomotor stimulants. **Neuropharmacol.** 12: 451-462 (1973).
- Vorhees CV. Reliability, sensitivity and validity of behavioral indices of neurotoxicity. **Neurotoxicol Teratol.** 9: 445-464 (1987).
- Wallas SI. y Geengard P. Protein Phosphorylation and neuronal function. **Pharm. Rev.** 43, 299-349 (1991).
- Wang HW, Wysocki C.J y Gold GH. Induction of olfactory receptor sensitivity in mice. **Science** 260, 998-1000 (1993)
- Weiss S., Ellis J., Hendley DD. y Lenox RH. Translocation and activation of PKC in striatal neurons in primary culture: Relationship to phorbol dibutyrate actions on the inositol phosphate generating system and neurotransmitter release. **J. of Neurochem.** 52 (2), 530-536 (1989).
- Wichmann T, DeLong MR. Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. **Adv. Neurol.** 60: 53-61 (1993).

- Wieloch T., Cardell M., Bingren H, Ziving J. y Saitoh T. Changes in the activity of protein kinase C and the differential subcellular redistribution of its isozymes in the rat striatum during and following transient forebrain ischemia. **J. of Neurochem.** 56, 1227-1235 (1991).
- Wiesel TN. Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. **Nature** 299, 583-591 (1982)
- Williams M. y Rodnight R. Protein Phosphorylation in nervous tissue: possible involvement in nervous tissue function and relationship to cyclic nucleotide metabolism. **Prog. Neurobiol.** 8, 183-250 (1977).
- Williams RW, Herrup K. The control of neuron number. **Ann. Rev. Neurosci.** 11:423-453 (1988).
- Wise RA. Intracranial self-stimulation mapping against the lateral boundaries of the dopaminergic cells of the substantia nigra. **Brain Res.** 213: 190-194 (1981).
- Whishaw IQ, Gorny B, Tran-Nguyen LTL, Castaneda E, Miklyaeva EI, Pellis SM. Making two movements at once: impairments of movement, posture, and their integration underlie the adult skilled reaching deficit of neonatally dopamine-depleted rats. **Behav. Brain Res.** 61: 65-77 (1994).
- Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine mediated behavioral responses. **Cell** 79: 729-742 (1994).
- Yamamoto BK, Freed CR. The trained circling rat: a model for inducing unilateral caudate dopamine metabolism. **Nature** 298: 467-468 (1982).
- Yamamoto BK. y Freed CR. Asymmetric dopamine and striatum metabolism in nigrostriatal and limbic structures of the trained circling rat. **Brain Res.** 297,115-119 (1984)
- Yamamura H y Snyder SH. Muscarinic Cholinergic binding in rat brain. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, 71, 1725-1729 (1974).
- Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ. Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 1291-1295 (1991).
- Zwiers H., Veldhuis HD., Schotland P. y Gispen WH. ACTH, cyclic nucleotides, and brain proteins phosphorylation in vitro. **Neurochem Res.** 1, 669-677 (1976).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Dr. Julio M. Azcurra, director del presente trabajo de tesis, por sus valiosos consejos y por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio. Además quiero agradecerle por mostrarme en todo momento la importancia de pensar y analizar los experimentos desde un punto de vista biológico integral.

A la Dra. A. B. Oestreicher (RMI, Universidad de Utrecht, Holanda) por haberme cedido los anticuerpos anti-GAP-43 que utilicé en este trabajo, por sus valiosos consejos y por haberme permitido colaborar con su grupo de investigación mediante una pasantía en su laboratorio.

Un agradecimiento especial a los compañeros de trabajo: Gustavo I., Jorge R., Marcelo W., Ricardo C., Elsa M., Emi A., Gabriela S., Corina V., Fabio D. y Andrei K.

A Guillermo Mendizábal por la ayuda técnica brindada y a los licenciados Martín Cammarota y Santiago Werbajh.

Al CONICET por haberme otorgado las becas que me permitieron desarrollar el presente trabajo de tesis y por financiar económicamente parte del proyecto.

**Dedico el presente trabajo
a mi familia por el apoyo que
me brindan día a día.**

4706

B-50/GAP-43 Phosphorylation and PKC Activity Are Increased in Rat Hippocampal Synaptosomal Membranes After an Inhibitory Avoidance Training*

Marjén Cammarota,¹ Gustavo Paratcha,¹ Miguelina Levi de Stein,¹ Ramón Bernabeu,¹ Iván Izquierdo,² and Jorge H. Medina^{1,4}

(Accepted)

Several lines of evidence indicate that protein kinase C (PKC) is involved in long-term potentiation (LTP) and in certain forms of learning. Recently, we found a learning-specific, time-dependent increase in [³H]phorbol dibutyrate binding to membrane-associated PKC in the hippocampus of rats subjected to an inhibitory avoidance task. Here we confirm and extend this observation, describing that a one trial inhibitory avoidance learning was associated with rapid and specific increases in D-50/GAP-43 phosphorylation *in vitro* and in PKC activity in hippocampal synaptosomal membranes. The increased phosphorylation of D-50/GAP-43 was seen at 30 min (+33% relative to naive or shocked control groups), but not at 10 or 60 min after training. This learning-associated increase in the phosphorylation of D-50/GAP-43 is mainly due to an increase in the activity of PKC. This is based on three different sets of data: 1) PKC activity increased by 24% in hippocampal synaptosomal membranes of rats sacrificed 30 min after training; 2) D-50/GAP-43 immunoblots revealed no changes in the amount of this protein among the different experimental groups; 3) phosphorylation assays, performed in the presence of bovine purified PKC or in the presence of the selective PKC inhibitor CGP 41251, exhibited no differences in D-50/GAP-43 phosphorylation between naive and trained animals. In conclusion, these results support the contention that hippocampal PKC participates in the early neural events of memory formation of an aversively-motivated learning task.

KEY WORDS: D-50/GAP-43, PKC; protein phosphorylation; hippocampus; memory; learning.

INTRODUCTION

LTP is an activity-dependent long-lasting modification of synaptic efficacy that has been repeatedly pro-

posed as a molecular model for certain forms of learning and memory (1,2).

The early stages of hippocampal LTP are highly dependent on PKC activity (3-7). Furthermore, it has been shown that both *in vitro* and *in vivo* LTP are accompanied by an increased phosphorylation of D-50/GAP-43 (6-9), a nervous-tissue specific substrate of PKC. D-50/GAP-43 is localized in the presynaptic compartment and it has been also implicated in neurite outgrowth and regeneration, and neurotransmitter release (for reviews see ref. 10, 11).

The involvement of PKC in several forms of learning has been recently demonstrated (5,12-16). During

¹ Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Biología Celular, Depso. Biología, FCEyN, UBA, Buenos Aires, Argentina.

³ Centro de Memoria, Instituto de Biociencias, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

⁴ Address reprint requests to: Dr. Jorge H. Medina, Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, UBA, Paraguay 2155, 3° piso, (1121) Buenos Aires Argentina.

* Special issue dedicated to Dr. Eduardo Soto.

the acquisition of nictitating membrane conditioning in the rabbit, there is an increase in hippocampal PKC activity (15,16). Mutant mice lacking PKC, exhibited impairments in spatial and contextual learnings (5). Recently, we found that the bilateral blockade of hippocampal PKC causes full amnesia of an inhibitory avoidance learning task in rats only when the highly specific inhibitor of PKC, CGP 41321, was injected immediately or 30 min posttraining, but not when given 120 or 180 min after training (13). Moreover, we have demonstrated that there is a learning specific, time-dependent increase in membrane associated PKC in the hippocampus of rats submitted to this learning paradigm (17).

These results suggest that the activation of hippocampal PKC is a necessary step in the early neural events mediating the acquisition and consolidation of an inhibitory avoidance learning (2). To confirm and extend these observations, we studied the *in vitro* phosphorylation of the presynaptic specific substrate of PKC, B-50/GAP-43 and the activity of PKC in synaptosomal membranes of rats subjected to a step-down inhibitory avoidance task.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Inhibitory Avoidance Training. We used male Wistar rats from our own breeding stock (3 month, 250-280 g). They were housed five to a 50 x 40 x 15 cm steel cage with a grid-like stainless steel lid. Water and Purina Lab Chow were freely available. The animal room was on a 12 h light/dark cycle. The rats were separated into 3 experimental groups: (1) Animals that were withdrawn from their home cages and sacrificed immediately (naive group); (2 and 3) Animals withdrawn from their home cages and exposed to a 50 x 25 x 25 cm acrylic box, with a frontal glass panel and a floor made of parallel 1 mm caliber bronze bars, spaced 0.8 cm apart. A 5 cm high, 8 cm wide platform was placed on the left extreme of the box. These 2 groups were submitted to different behavioral procedures, as follows: (2) Animals were placed on the platform and received a 0.35 mA, 2-s footshock immediately after they stepped down to the grid (trained group). (3) Animals were placed in the box, directly over the electrified grid, receiving a 0.35 mA, 2-s footshock (shocked group). The procedure used in group 2 corresponds to an *one trial* inhibitory avoidance training (13,17). The animals of groups 2 and 3 were killed by decapitation at different time intervals (10, 30, 60 min) after each procedure.

Synaptic Plasma Membrane (SPM) Preparation. All the experiments were performed at least 4 times, using groups of 5 animals for each experimental condition. After decapitation, brains were quickly removed and the hippocampus rapidly dissected, pooled on ice and weighed. Tissue (10% w/v) was added to cold 10 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer, containing 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 15 µg/ml n-ethylmaleimide, 10 µg/ml bacitracin, 0.1 mM ammonium molybdate, 1 mM NaF and 1 mM sodium orthovanadate (homogenization buffer). SPM was obtained according to the method of the Roberts and coworkers (18) with minor modifications. In brief, tissue

homogenization was performed in a glass homogenizer fitted with a loose teflon pestle (clearance 0.25 mm, 10 strokes, 1 J/100 RPM). Following centrifugation at 1000 g for 10 min, the pellets were washed twice and then discarded. Supernatants were collected and centrifuged again at 15000 g for 20 min; following two washes, the pellets were resuspended in buffer Tris-HCl 1 mM, pH 7.4, (plus the inhibitors as in the homogenization buffer) and subjected to an osmotic shock by incubating for 10 min at 4°C with continuous stirring. After been centrifuged at 20000 g for 30 min, the pellets were resuspended in homogenization buffer, loaded on a discontinuous sucrose gradient (0.8 to 1.2 M) and centrifuged at 100000 g for 120 min. The material floating on the 1.2 M band was collected, washed in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and pelleted at 150000 g for 90 min and finally resuspended in the same buffer. Protein concentration was determined by the method of Bradford (19).

SPM Protein Phosphorylation Assay. *In vitro* endogenous phosphorylation was performed under conditions known to activate PKC (20); briefly, aliquots of SPM (10 µg) were preincubated 5 min at 30°C in a final volume of 25 µl in buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.4, containing 10 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂. The reaction was initiated by the addition of 7.5 µM ATP and 2µCi [³²P] ATP and stopped 1 min later with the addition of 12.5 µl of 3X Laemmli-sample buffer. In some experiments, 10 µl of bovine PKC (2 pmol/mg/ml), purified as in (21,22), or PKC inhibitors were added to the incubation medium.

Electrophoresis. Samples (containing) of SPM protein (1-40 µg) were subjected to one dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gels (12%) were then stained and autoradiographed by exposing them to a Dupont-Reflection film sheet. Densitometric analysis of the film was performed by using a MCID Image Analysis System (5.01v, Image Research Inc., Ontario, Canada).

Western Blot of B-50/GAP-43. SPM proteins (1-40 µg) were electrophoretically transferred (3 h, 400 mA) to PVDF membranes as described (23). After preincubation in blocking buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% w/v dried non-fat milk, 140 mM NaCl, 0.1% v/v Tween 20), the PVDF membrane was incubated with a specific affinity-purified rabbit IgG (1/1000) obtained from serum 8920 (kindly provided by Dr. A. B. Osterweil) or a monoclonal antibody (1/2500) (clone 1A9-71010, SHIMA Co.) (24,25) for 12 h at 4°C. Immunoreactivity against B-50/GAP-43 was assessed by using a biotinylated secondary antibody and a horseradish peroxidase-conjugated biotin-avidin complex (Vectastain Elite kit, Vector Labs) and visualized using 3,3'-Diaminobenzidine as chromogen.

Determination of PKC Activity. PKC activity was determined by an *in vitro* phosphorylation assay utilizing Histone H1S as substrate (26). The reactions were performed using 10 µg of SPM proteins in 25 µl (final volume) of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 0.2 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoethanol, 10 µM ATP, 100 µg/ml PKA inhibitor (Sigma), 0.6 µg/ml Histone H1S and 1µCi [³²P] ATP, during 1 min at 30°C and stopped by adding 12.5 µl of a 3X SDS Laemmli-sample buffer. The labeled phosphoproteins were separated on a 15% SDS-PAGE and following staining and destaining, the gels were dried and exposed to a Dupont-Reflection film. The histone protein band was cut from the dried stained gel and the radioactivity incorporated counted in a liquid scintillation counter. The total PKC activity was calculated as pmol ³²P incorporated per min per mg of protein.

RESULTS AND DISCUSSION

To assess whether B-50/GAP-43 endogenous phosphorylation is altered after an inhibitory avoidance train-

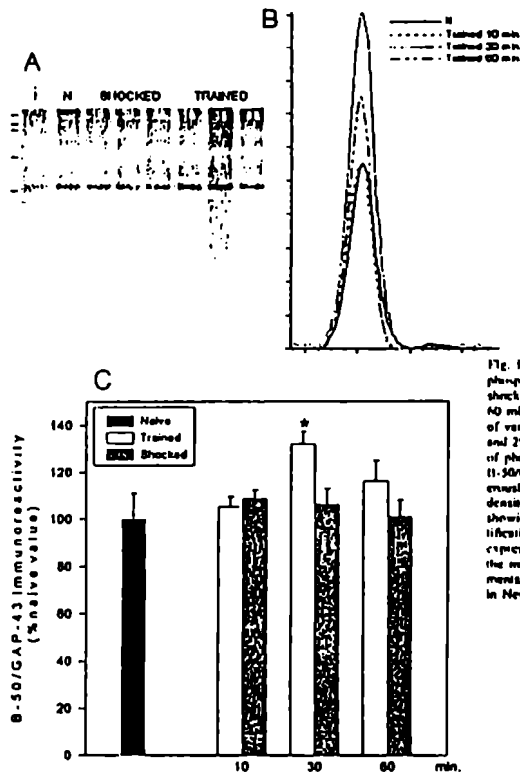


Fig. 1. (A) Representative autoradiogram showing the *in vitro* phosphorylation of hippocampal SPM proteins from naive (N), shocked and trained rats at different time points (10, 30 and 60 min.) after an inhibitory avoidance learning. The positions of various molecular weight standards (205, 116, 97.4, 66, 45 and 29 kD) are shown on the left. Lane 1: Immunoprecipitation of phosphoproteins (50 μ g) by using a polyclonal rabbit anti D-50/GAP-43 antibody (1/400 dilution from serum B613, generously provided by Dr. A. B. Ostreicher). (B) Detail of a densitometric scan of (A) (lanes N, Trained 10, 30 and 60) showing the peaks corresponding to D-50/GAP-43. (C) Quantification of D-50/GAP-43 *in vitro* phosphorylation. Data are expressed as percentage of naive control values and represent the mean \pm SE values of at least four independent experiments. Each determination was assayed in triplicate. * $p < 0.01$ in Newman-Keuls after ANOVA.

ing, we obtained SPM from hippocampus of naive, shocked and trained animals and subjected them to an *in vitro* phosphorylation assay under conditions which are suitable for PKC activation (20,26-28). After one dimensional SDS-PAGE, the most prominent phosphoband observed in the autoradiography is that of D-50/GAP-43; thus, in SPM the degree of D-50/GAP-43 phosphorylation can be quantified without immunoprecipitation (28). The identity of the putative D-50/GAP-43 phosphoband was assessed by immunoprecipitation of phosphorylated SPM protein by using an affinity purified anti D-50/GAP-43 rabbit antibody (Fig. 1). Fig. 2

shows that *in vitro* phosphorylation of D-50/GAP-43 was probably due to PKC activity, since when SPM were phosphorylated in the presence of CGP 41231, Polymyxin B or H-7, the D-50/GAP-43 phosphorylation was markedly inhibited. It is important to mention here, that CGP 41231, a staurosporine derivative, is a highly specific inhibitor of PKC (13).

As can be seen in Fig. 1, inhibitory avoidance training is accompanied by an increase in D-50/GAP-43 phosphorylation at 30 min (+35%), but not at 10 or 60 min posttraining. This increase appears to be training-specific since the shocked groups did not show any

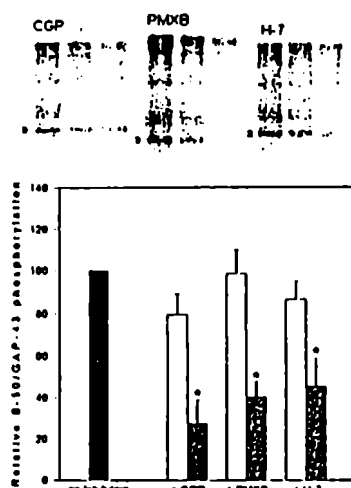


Fig. 2. Upper panel: representative autoradiographs showing the *in vitro* phosphorylation of SPM proteins in the absence (lanes 1), or in the presence of two concentrations of different PKC inhibitors (lanes 2 and 3) for CGP 41231: 10^{-6} M (lane 2), 10^{-7} M (lane 3), for Polymyxin B (PMXB): 4500 IU/ml (lane 4), 9000 IU/ml (lane 5), for H-7: 10^{-6} M (lane 6), 10^{-7} M (lane 7). The small arrows on the left indicate β -50/GAP-43. Lower panel: quantification of the *in vitro* phosphorylation of β -50/GAP-43 in the absence or in the presence of the same concentrations of the PKC inhibitors. Data are expressed as percentage of control values (in the absence of PKC inhibitors) and represent the mean \pm S.D. of 4 independent determinations done in triplicate. * $p < 0.001$ in Newman-Keuls after ANOVA.

modification in the *in vitro* phosphorylation of β -50/GAP-43 when compared with naive controls.

This learning-associated increase in phosphorylation *in vitro* of a specific presynaptic substrate of PKC (10,11), could be due to increased PKC activity, an increased amount of β -50/GAP-43, or a change in the *in vivo* phosphorylation state of this protein.

The increased phosphorylation of β -50/GAP-43 observed in the present study does not seem to be due to a difference in β -50/GAP-43 protein levels because densitometric quantitation of the western blots performed with two different antibodies against β -50/GAP-43 did not show any difference between controls and trained groups (Fig. 3).

To test if the change in the endogenous phosphorylation of β -50/GAP-43 caused by inhibitory avoidance

training could be due to an increased PKC activity, SPM preparations of naive, shocked and trained groups were *in vitro* phosphorylated in the presence of an excess of exogenously added bovine purified PKC (29) or in the presence of the PKC inhibitor CGP 41231. Under these conditions, the differences observed in Fig. 1 and Fig. 4A and B (lanes 1 and 2) were completely abolished (Fig. 4A and B, lanes 3 and 4; in both cases $p > 0.1$ in two-tailed Student *t* test, $n = 3$), suggesting that the increased β -50/GAP-43 *in vitro* phosphorylation observed in trained animals is probably due to a difference in PKC activity.

To further determine this assumption, we measured total PKC activity in SPM from the different groups, in the presence of an excess of Histone H1S as substrate. Fig. 5 shows the results of this set of experiments; a significant increase of 24% (with respect to naive and shocked groups) was observed in the 30 min posttraining time point; moreover, the temporal course of this increase parallels the temporal course of the changes observed in the phosphorylation of β -50/GAP-43.

These results are in well agreement with recent findings demonstrating that rats submitted to an inhibitory avoidance task showed a learning-specific, structure-selective and time-dependent increase in the amount of membrane-associated PKC (17). Furthermore, it has been reported that after classical conditioning in the rabbit there is an increase in [³H]phorbol dibutyrate binding (15) and in synaptosomal PKC activity (16) in the hippocampus. Two different learning paradigms in the chick are associated with an increase in PKC activity and an increment in PKC substrate phosphorylation in selected brain regions (12,30). Associative learning in *Hermissenda* is accompanied by an activation of PKC (31,32) and phosphorylation of a low molecular weight G protein (33-35). In addition, spatial but not cued discrimination is related with alterations in membrane-associated PKC (36).

PKC only phosphorylates the SER 41 residue of β -50/GAP-43 (37,38). This protein is also *in vitro* phosphorylated by Casein Kinase II on SER 192, 193 and on THR 88, 89 and 95 (39,40). In order to exclude a dual participation of PKC and Casein Kinase II in our *in vitro* phosphorylation assay, we performed endogenous phosphorylation of SPM in the presence of Heparin, which is known to be a potent inhibitor of Casein Kinase II activity. The presence of heparin did not alter the differences in β -50/GAP-43 phosphorylation among naive, shocked and trained groups or the apparent temporal course of these modifications (data not shown).

It is generally assumed that an increase in post-hoc phosphorylation experiments is associated with a de-

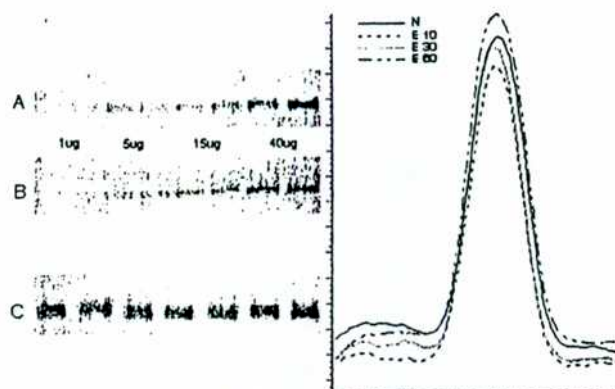


Fig. 3. (A and B): western blot analysis of B-50/GAP-43 immunoreactivity using different amounts of hippocampal SPM proteins from naive (N) and trained animals sacrificed 30 min posttraining, utilizing B-50/GAP-43 rabbit polyclonal antibody (24) or an anti-B-50/GAP-43 monoclonal antibody (SIGMA), respectively. (C): Immunoblot analysis of hippocampal SPM proteins (25 μ g) from naive (N), shocked (S), or trained animals (E) using polyclonal antibody against B-50/GAP-43 (24). On the right part of the figure, densitometric scans of C (lanes N, E10, E30, and E60) are shown.

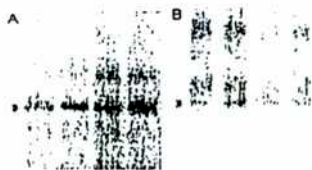


Fig. 4. A: Autoradiogram showing the *in vitro* phosphorylation of SPM proteins from naive (lanes 1 and 3) and trained rats (lanes 2 and 4), in the absence (lanes 1 and 2), or in the presence of purified bovine PKC (lanes 3 and 4). The arrows on the left indicates B-50/GAP-43. B: Autoradiogram of phosphoproteins of SPM fractions from naive and trained animals (same lanes as in A), in the absence (lanes 1 and 2) or in the presence of the selective PKC inhibitor (TIP 4121) (10^{-1} M) (lanes 3 and 4).

creased phosphorylation *in vivo*. However, it may also reflect an increase in phosphorylation of the substrate *in vivo*, as suggested by studies on phosphorylation and LTP (8,9). LTP increased the *in vivo* labelling of B-50/GAP-43 (9). These *in vivo* data parallel the findings of increased B-50/GAP-43 phosphorylation *in vitro* after LTP using the identical assay as in the present study (8), indicating that the increased phosphorylation observed *in vitro* (Fig. 1 and lanes 1 and 2 of Fig. 4A and B)

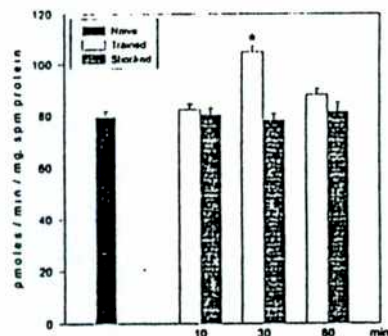


Fig. 5. Inhibitory avoidance learning-related changes in PKC activity in SPM fractions from naive, shocked and trained animals. Data are expressed in pmoles of 32 P incorporated per min per mg protein and represent the mean \pm S.D. of at least 4 determinations done in quadruplicate. * $p < 0.005$ in Newman-Keuls after ANOVA.

probably reflects an increase in the *in vivo* phosphorylation (30). Future studies using quantitative immunoprecipitation following 32 P *in vivo* labeling (6,9) will

probably help elucidate the in vivo phosphorylation state of β -50/GAP-43 in different pathophysiological conditions.

In conclusion, an inhibitory avoidance learning is associated with an increase in both the in vitro phosphorylation of β -50/GAP-43 and in the activity of PKC in synaptosomal membranes from the hippocampus. The present results also endorse the hypothesis that hippocampal PKC is involved in the early stages of memory processing of an inhibitory avoidance task (2,13,14,17).

ACKNOWLEDGMENTS

This work is dedicated to Prof. Eduardo Soto. It was supported by Grants of the University of Buenos Aires (Argentina), Fundación Antorchas-Vitre (Argentina-Brazil) and FAPESP (Brazil). The authors want to thank Dr. Julia Arcurus for his helpful comments and Dr. A. P. Oestreicher for providing us with rabbit antibodies against β -50/GAP-43.

REFERENCES

- Hits, T. P. V., and Collingridge, B. I. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-35.
- Izquierdo, I., and Medina, J. H. 1995. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol. Learning & Memory* 63:19-24.
- Akers, R. F., Lovinger, D. M., Colley, P. A., Linden, D. J., and Routenberg, A. 1986. Translocation of PKC activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science* 231:587-589.
- Maffei, R., Molinari, U. V., and Liden, R. V. 1988. Persistent PKC activity underlying long-term potentiation. *Nature* 335:820-824.
- Abeliovich, A., Paylor, R., Chen, C., Kim, J. J., Webster, J. M., and Tonegawa, S. 1993. PKC δ mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* 75:1261-1271.
- Ramirez, U. M. J., Du Gama, P. N. P., Urban, J. J. A., Kinay, D., Isag, T., Pasticelli, P., Oestreicher, A. B., and Hippen, W. H. 1995. Temporal differences in the phosphorylation state of pre- and post-synaptic PKC substrates β -50(GAP-43) and neurogranin during long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* 270:11892-11898.
- Akers, R., and Routenberg, A. 1983. PKC phosphorylates a 47 kD protein (F1) directly related to synaptic plasticity. *Brain Res.* 334:147-151.
- Nehru, R. B., Linden, D. J., and Routenberg, A. 1989. Phosphoproteins localized in presynaptic terminal linked to persistence of long-term potentiation (LTP): quantitative analysis of two-dimensional gels. *Brain Res.* 497:39-42.
- Hannell, C., Nunez, M. O., Hippen, W. H., and Corraletti, R. 1992. Phosphorylation of the presynaptic protein β -50 (GAP-43) is increased during electrically induced long-term potentiation. *Neuron* 8:843-848.
- Hippen, W. H., Melander, H. B., De Graan, P. N. E., Oestreicher, A. B., Schram, L. H., and Schramm, P. 1991. Role of the growth-associated protein β -50(GAP-43) in neuronal plasticity. *Mol. Neurobiol.* 5:61-65.
- Srinivasar, S. M., Varamba, T., and Fischman, M. C. 1992. GAP-43 as a plasticity protein in neuronal form and repair. *J. Neurobiol.* 23:507-520.
- Duchalinski, R., Foster, J., and Rose, S. P. R. 1990. Memory formation: the chick depends on membrane-bound PKC. *Brain Res.* 535:131-138.
- Jermolinsky, D., Quilford, J. A., Walz, R., De Silva, R. C., Medina, J. H., and Izquierdo, I. 1994. Post-training intrahippocampal infusion of PKC inhibitors causes amnesia in the rat. *Behav. Neural Biol.* 61:107-109.
- Jermolinsky, D., Quilford, J. A., Walz, R., De Silva, R. C., Medina, J. H., and Izquierdo, I. 1994. Infusion of a PKC inhibitor into the amygdala or entorhinal cortex causes retrograde amnesia in rats. *Commun. Biol.* 11:179-183.
- Scharenberg, A. M., Ochs, J. L., Schreurs, B. G., Craig, A. M., and Altman, D. L. 1991. PKC redistribution within CA1 stratum oriens during acquisition of activating membrane crosslinking in the rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6637-6641.
- Somayoshi-Kusashiki, K., Lester, D. S., Schreurs, B. G., and Altman, D. L. 1993. Associative learning potentiates PKC activation in synaptosomes of the rabbit hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4286-4289.
- Bernabeu, R., Izquierdo, I., Cammarota, M., Jermolinsky, D., and Medina, J. H. 1995. Learning-specific, time-dependent increase in [³H]phorbol dibutyrate binding to PKC in selected regions of rat brain. *Brain Res.* 685:163-168.
- De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodriguez de Lores de Arnal, U., and Gomez, C. J. 1961. On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:229-235.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Kristiansson, O. I., Zwiers, H., Oestreicher, A. B., and Hippen, W. H. 1992. Light and electron localization of β -50(GAP-43) in the rat spinal cord during transsynaptic degenerative atrophy and regeneration. *J. Neurosci. Res.* 32:93-109.
- Kiama, T., Ito, M., Kikawa, V., and Nishizuka, Y. 1986. Assay and purification of PKC. *Methods in Enzymol.* 134:349-352.
- Gomez, M. L., Medrano, E. P., Cofferata, E. O. A., and Telles-Iñan, M. T. 1988. PKC is differentially regulated by thrombin, insulin and epidermal growth factor in human mammary tumor cells. *Exp. Cell Res.* 175:74-80.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Fluorophore transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Oestreicher, A. B., Van Dongen, C. J., Zwiers, H., and Hippen, W. H. 1983. Affinity-purified anti- β -50 protein antibody: interference with the function of the phosphoprotein β -50 in synaptic plasma membranes. *J. Neurochem.* 41:267-279.
- Abeliovich, M., Lubke, U., Vandenmeersch, O., Gheuens, J., and Oestreicher, A. B. 1992. Immunocytochemical detection of the growth-associated protein β -50 by newly characterized monoclonal antibodies in human brain and muscle. *J. Neurobiol.* 23:309-321.
- Cole, G., Ibbitt, R. R., Hansen, L. A., Terry, R. D., and Smith, T. 1988. Decreased levels of PKC in Alzheimer brain. *Brain Res.* 453:165-174.
- Zwiers, H., Veldius, H. D., Schramm, P., and Hippen, W. H. 1976. ACTH, cyclic nucleotides, and brain proteins phosphorylation in vitro. *Neurochem. Res.* 1:660-677.
- Hilberg, J., De Graan, P. N. E., Schramm, L. H., and Hippen, W. H. 1986. Diacetylmethylglycerol and phorbol-esters enhance phosphorylation of phosphoprotein β -50 in native synaptic plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134:1007-1012.
- Crippin, P. J., and Hippen, W. H. 1989. Evidence for a single PKC-mediated phosphorylation site in rat brain protein β -50. *J. Neurochem.* 53:1893-1901.
- Shen, F. S., McCabe, H. J., Hertz, G., and Rosenberg, A. 1993. Learning selectively increases protein kinase C substrate phospho-

phosphorylation in specific regions of the chick brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2703-2709.

31. Alkon, D. L., and Ramussen, H. 1988. A spatial-temporal model of cell activation. *Science* 239:998-1003.
32. Laferriere, J. J., Crubler, D. A., and Alkon, D. L. 1988. Enhancement of synaptic potentials in rabbit CA1 pyramidal neurons following classical conditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1672-1676.
33. Neary, J. T., Crow, T., and Alkon, D. L. 1981. Change in a specific phosphoprotein band following associative learning in *Hermissenda*. *Nature* 293:658-660.
34. Nelson, T. J., and Alkon, D. L. 1987. Specific protein changes during memory acquisition and storage. *Neurosci* 10:75-79.
35. Nelson, T. J., Collin, C., and Alkon, D. L. 1990. Isolation of a G protein that is modified by learning and reduces potassium currents in *Hermissenda*. *Science* 247:1479-1483.
36. Goshal, S., Odeh, J. L., Mikhlin, M., Olson, D. S., and Alkon, D. L. 1993. Protein kinase C in the hippocampus is altered by spatial but not cued discrimination: a component task analysis. *Brain Res.* 676:53-62.
37. Nielsender, H. B., Schaama, L. G., Van Rosen, H., Kasperaitis, M., Oestreicher, A. B., Gijzen, W. H., and Schuman, P. 1990. Alteration of serine 41 in the neuron specific protein 11-50 (GAP-43) prohibits phosphorylation by PKC. *J. Neurochem.* 55:1442-1445.
38. Di Luca, M., Chisari, M., De Gennaro, P. M. R., Oestreicher, A. B., Gijzen, W. H., and Cattabeni, F. 1991. Microsurgery reduces the phosphorylation of the PKC substrate 11-50k(GAP-43) in rat cortex and hippocampus. *Brain Res.* 538:93-101.
39. Pissano, M. R., Hegarty, M. J., Reisman, R. M., and Duker, L. A. 1988. Phosphorylation of protein 11-50k(GAP-43) from adult rat brain cortex by Casein Kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155:1207-1212.
40. Apel, E. D., Litchfield, D. W., Clark, R. H., Krebs, R. G., and Stone, D. R. 1991. Phosphorylation of neurocabinin (GAP-43) by Casein Kinase II. *J. Biol. Chem.* 266:10544-10551.