

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**LOCALIZACIÓN DE DIVERSOS ASPECTOS DEL
METABOLISMO DEL ÁCIDO GLIOXÍLICO EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Javier Capilla San Martín

Bajo la dirección del Doctor:

Manuel Pizarro Díaz

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2162-1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

TESIS DOCTORAL

***LOCALIZACIÓN DE DIVERSOS ASPECTOS
DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO
GLIOXÍLICO EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL DE LA RATA***

JAVIER CAPILLA SAN MARTÍN

MADRID, 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

TESIS DOCTORAL

***LOCALIZACIÓN DE DIVERSOS ASPECTOS DEL
METABOLISMO DEL ÁCIDO GLIOXÍLICO EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA***

- 1. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE LA GLIOXILATO-DESHIDROGENASA EN EL S.N.C. DE LA RATA.**
- 2. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE MOLÉCULAS DERIVADAS DE LA TRANSAMINACIÓN DEL GLIOXILATO CON MOLÉCULAS AMINADAS EN EL S.N.C DE LA RATA.**
- 3. INVESTIGACIÓN SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL GLIOXILATO VIA GLIOXILATO-DESHIDROGENASA EN LOS PROCESOS DE ACTIVACIÓN NEURONAL POR ACCIÓN DE LA NICOTINA.**

JAVIER CAPILLA SAN MARTÍN

MADRID, 2003

D. RICARDO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, profesor de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas e investigador invitado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario “La Paz” y D. MANUEL PIZARRO DÍAZ, profesor del Dpto. de Patología Animal II de la Universidad Complutense de Madrid, directores del trabajo de Tesis Doctoral presentado por D. JAVIER CAPILLA SAN MARTÍN

CERTIFICAN:

Que dicha Tesis Doctoral titulada “LOCALIZACIÓN DE DIVERSOS ASPECTOS DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO GLIOXÍLICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA” se ha realizado en el Instituto Ramón y Cajal de Madrid (C.S.I.C) y Hospital Universitario “La Paz”, en colaboración con el Dpto. de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, bajo su dirección, y que este trabajo constituye la memoria de tesis doctoral para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, a 8 de mayo de 2003

Fdo.: Ricardo Martínez Rodríguez

Fdo.: Manuel Pizarro Díaz

INDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	4
<i>OBJETIVOS</i>	12
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	14
A.- LOCALIZACIÓN HISTOENZIMOLÓGICA DE DESHIDROGENASAS Y OXIDOREDUCTAS	14
<i>Medios histoquímicos</i>	16
B.- LOCALIZACIÓN DE MOLÉCULAS ORIGINADAS POR TRANSAMINACIÓN DEL ÁCIDO GLIOXÍLICO	20
<i>Síntesis de la molécula inmunizante</i>	20
<i>Inmunización de animales</i>	21
<i>Aislamiento o Purificación del antisuero</i>	21
<i>Reacción Inmunohistoquímica</i>	24
<i>RESULTADOS</i>	32
REACCIONES HISTOENZIMOLÓGICAS.....	32
REACCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA (= REACCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA)	39
<i>DISCUSIÓN</i>	45
<i>INVESTIGACIÓN SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL GLIOXILATO VIA GLIOXILATO- DESHIDROGENASA EN LOS PROCESOS DE ACTIVACIÓN NEURONAL POR ACCIÓN DE LA NICOTINA</i>	54
INTRODUCCIÓN.....	54
MATERIAL Y MÉTODOS	56
RESULTADOS	59
DISCUSIÓN	61
<i>PROYECTOS FUTUROS DE INVESTIGACIÓN A DESARROLLAR EN RELACIÓN CON LOS HECHOS OBSERVADOS</i>	64
<i>FIGURAS</i>	65
GLIOXILATO DESHIDROGENASA	66
INMUNOHISTOQUÍMICA	91
<i>CORTEZA PREFRONTAL</i>	94
<i>CORTEZA FRONTOPARIETAL</i>	107
<i>CORTEZA TEMPORAL</i>	130
<i>HIPOCAMPO POSTERIOR</i>	142
NICOTINA.....	153
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	160

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado y apoyado para el desarrollo de esta tesis.

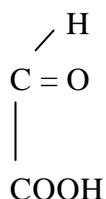
En primer lugar a los directores de esta Tesis, Prof. Dr. D. Ricardo Martínez Rodríguez y al Dr. D. Manuel Pizarro Díaz; a la Dra. Gloria Arenas y al Dr. Francisco González Romero, de la Universidad Católica de Valparaíso, por su inestimable ayuda al poner a mi disposición su experiencia en la obtención y purificación de anticuerpos; a todos los miembros del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Carlos III, y en especial a los doctores Antonio López Bravo y M^a José Alonso, por su ayuda desinteresada; a los miembros del Instituto Ramón y Cajal de Madrid (CSIC), y muy especialmente al Dr. Ricardo Martínez Murillo por su apoyo y ayuda; a la Dra. Raquel Grajera, profesora de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares; al Dr. D. Enrique de Miguel, jefe del Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Universitario “La Paz”, y al Dr. D. Ignacio Álvarez, adjunto del mismo Departamento; al Dr. D. Antonio Gómez, director del Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla, a Gloria Vallejo, jefa de servicio del I.N.T de Madrid, y a los demás compañeros de trabajo, en especial a Gerardo, M^a José y Esther; a mis cuñados Cuco y Maria; y a toda mi familia que siempre han estado y están ahí apoyándome, y, muy especialmente, a mi mujer y a los trastos de mis hijos, Javier y María.

INTRODUCCIÓN

ASPECTOS DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO GLIOXÍLICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA

INTRODUCCIÓN

El ácido glioxílico es un metabolito muy versátil, constituido por un grupo aldehído y otro carboxilo, que puede intervenir en numerosas reacciones y vías metabólicas



La existencia de vías metabólicas en las que esta molécula está involucrada fue primeramente puesta de manifiesto en bacterias, plantas y animales invertebrados (Quayle y cols., 1961; Yanagihara y cols., 1984; Balmforth y Thomson, 1984; Husic y Tolbert, 1987; Paszkowski y cols., 1989; McCammon y cols., 1990; Paszkowski y cols., 1990; Kim y Smith, 1994; Liu y cols., 1995; Hagishita y cols., 1996) y posteriormente en animales vertebrados y en humanos (Takada y cols., 1984; Maul y Schuster, 1986; Davis y col., 1989;

Wanders y cols., 1990; Yamagawa y cols., 1990; Davis y cols., 1992; Petrarulo y cols., 1992; Purdue y cols., 1992; Sharma y Schwille, 1992; Andy y cols., 1995).

El glioxilato puede ser sintetizado y catabolizado a través de diversas vías metabólicas (Mannaerts y Van Veldhoven, 1993; Fujiwara y Noguchi, 1995; Sakuraba y cols., 1996; Danpure, 1997; Masters, 1997; Poore y cols., 1997) en las que intervienen diversas enzimas (principalmente deshidrogenasas y transaminasas), que participan en la glicolisis, gluconeogénesis, ciclo de Krebs (shunt del glioxilato), degradación de purinas, metabolismo de lípidos, y en la transformación de glicina y de otros aminoácidos (Yanagihara y cols., 1984; Takada y cols., 1984; Balmforth y cols., 1984; Maul y Schuster, 1986; Paszkowski y Niedzielska, 1989; Davis y cols., 1989; Paszkowski y Niedzielska, 1990; Wanders y cols., 1990; Bradbury y Smyth, 1991; Davis y Goodman, 1992; Andy y cols., 1995; Sakuraba y cols., 1996; Hagishita y cols., 1996).

Muchas de las actividades metabólicas desarrolladas por el glioxilato se realizan con intervención de los peroxisomas, habiéndose observado que estas ultraestructuras son los sitios más importantes en la formación de las glioxilato-transaminasas (Takada y cols., 1984; Andy y cols., 1995; Sakaruba y cols., 1996; Theron y Papendorp., 1996; Master, 1997). La fiabilidad de la

hipótesis de que la estructura y función de los peroxisomas esté implicada en enfermedades humanas ha sido sugerida recientemente (Wilson, 1991).

Los peroxisomas son estructuras citoplasmáticas ubicuamente presentes en los seres vivos. Las funciones metabólicas de estos orgánulos incluyen la síntesis de plasmalógenos y de otros ésteres lipídicos, la beta-oxidación, especialmente de ácidos grasos de cadena larga y sus derivados, la inactivación de peróxido de hidrógeno por la catalasa peroxisómica, la gluconeogénesis, el catabolismo de purinas y poliaminas, y la detoxificación del etanol (Theron y Van Papendorp, 1996).

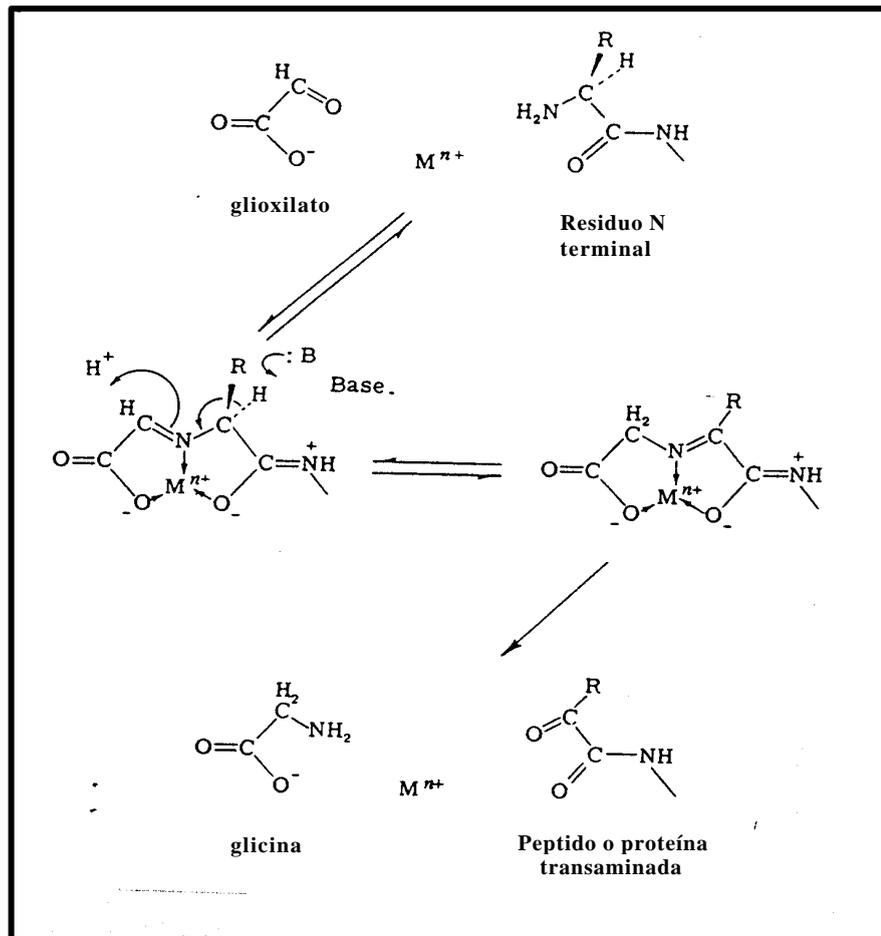
Investigaciones realizadas en hígado de peces (Sakaruba y cols., 1996) han demostrado que en los peroxisomas el glioxilato se convierte en glicina, por la acción de la alanina-glioxilato aminotransferasa, para la reutilización de los carbonos de la purina. Por otra parte, también se ha demostrado que muchas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento son péptidos que llevan un grupo amino en su carbono terminal que es esencial para desarrollar su actividad biológica, y que dichas moléculas se forman a partir de un precursor que se hidroxila en su residuo glicina, ocurriendo luego que el derivado hidroxiglicina se disocia para formar el péptido amidado y ácido glioxílico (Bradbury y Smyth, 1991).

El incremento de la concentración del ácido glioxílico, como consecuencia de la deficiencia de vías metabólicas catabólicas implicadas en dicho catabolismo (especialmente de actividades deshidrogenasas y transaminasas), puede dar origen a procesos patológicos como hiperoxalurias (Frydl, 1987; Sidhu y cols., 1987; Watts, 1992; Agamanolis y cols., 1993; Danpure, 1987, 1989, 1993, 1996, 1997, 1998) o manifestaciones neurológicas (Mahul y cols., 1993). Por otra parte, la deficiencia de los procesos enzimáticos implicados en la síntesis del ácido glioxílico pueden también ocasionar disturbios de las funciones biológicas, ya que se detendrían procesos, que como las transaminaciones, son necesarias para la formación de moléculas biológicamente activas o para bloquear la actividad de otras moléculas aminadas.

Se ha demostrado, además, que la transaminación del ácido glioxílico con moléculas aminadas puede desarrollarse con o sin intervención de actividades enzimáticas (Dixon y Fields, 1972; Bais y cols., 1991).

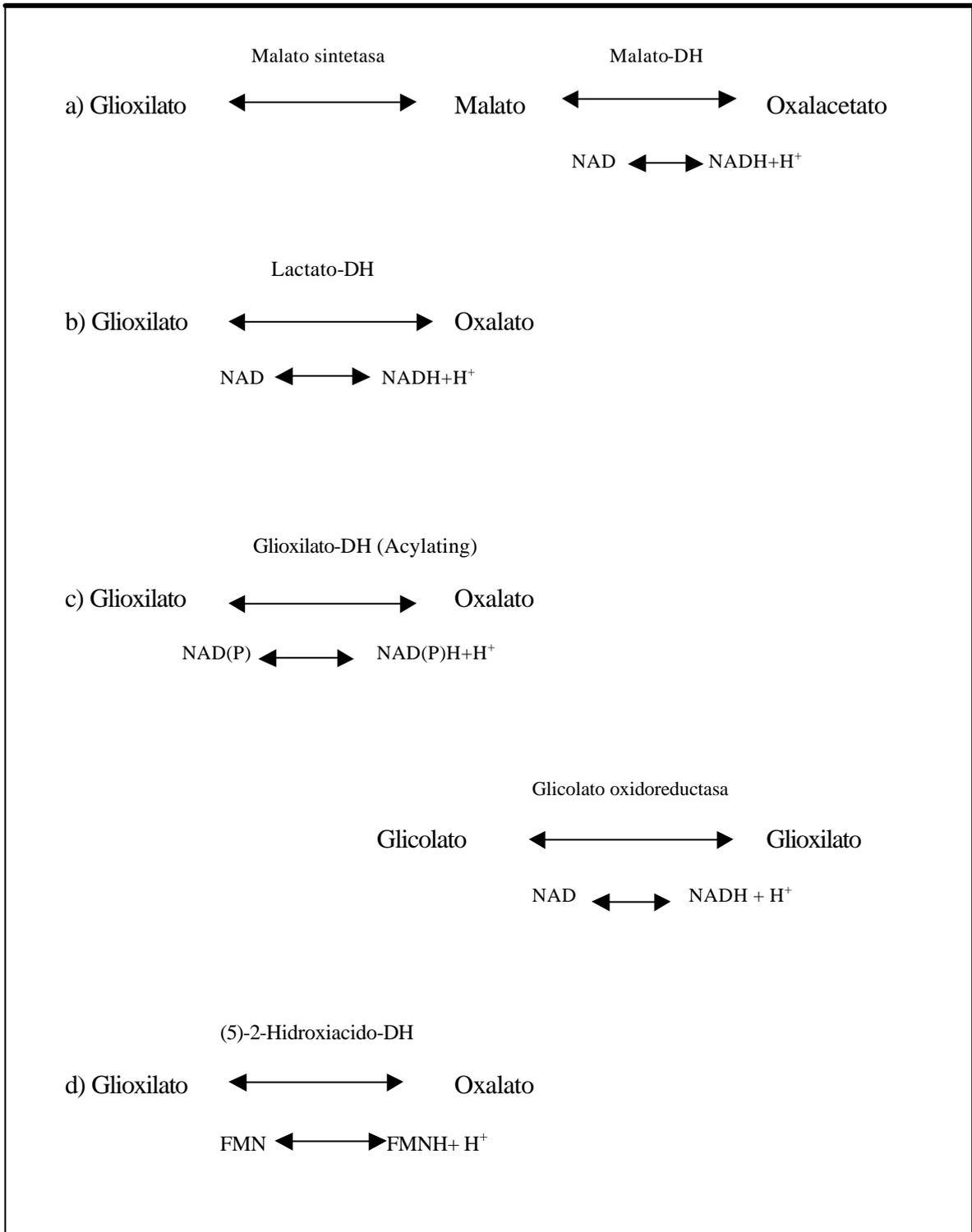
El hecho observado de la formación de compuestos fluorescentes como consecuencia de la reacción química entre el ácido glioxílico y aminos biógenas neuroactivas (Björklund y cols., 1972; Lindwall y Björklund, 1974 y 1983) ha inducido a utilizar esta reacción para determinar la localización de estructuras nerviosas monoaminérgicas, localización que se ha comprobado es de gran fiabilidad (Small y cols., 1990; Felten y cols., 1990; Machado y cols 1998).

La transaminación “in vitro” producida entre el ácido glioilico y moléculas aminadas ha sido descrita y expresada esquemáticamente por Fields y Dixon (1971) y Dixon y Fields (1972)



Diversas investigaciones han demostrado que el ácido glioilico puede también actuar como sustrato para la actividad de enzimas deshidrogenasas u oxido-reductasas. Estas deshidrogenasas pueden actuar en presencia de NAD, NADP o FMN, según el tipo de deshidrogenasa a considerar (Balmforth y Thomson, 1984; Husic y Tolbert, 1987; McCammon y cols., 1990)

ESQUEMA DE MAPA METABÓLICO



A pesar de haberse demostrado la existencia de alteraciones de la actividad de algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido glioxílico en disturbios del sistema nervioso (Frydl, 1987; Sidhu y cols., 1987; Watts, 1992; Agamanolis y cols., 1993; Mahul y cols., 1993; Danpure, 1997), hasta el momento, existen muy pocas investigaciones que hayan revelado la localización de algunas de esas actividades enzimáticas, a nivel microscópico y ultramicroscópico, en el sistema nervioso central tanto en estado normal como en el experimental (Martinez-Rodríguez y cols, 1996, 1997, 1998; Grajera y cols., 2000).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Investigar la localización del Glioxilato-deshidrogenasa en el cerebro, cerebelo y médula oblongada de rata durante el desarrollo, mediante métodos histoenzimológicos.
2. Investigar la localización de moléculas derivadas de la transaminación de glioxalato con moléculas aminadas. Dicha investigación se desarrollará mediante métodos inmunohistoquímicos en el cerebro, cerebelo y médula oblongada de ratas durante el desarrollo, tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica.
3. Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para ser comparados con los obtenidos en el futuro en condiciones patológicas y experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

A.- Localización histoenzimológica de Deshidrogenasas y Oxidoreductasas

La investigación de estas vías catabólicas, desde el punto de vista de la metodología histoenzimológica, debe sólo referirse a la actividad deshidrogenasa y oxidoreductasa que intervienen directamente sobre el ácido glioxílico, y no sobre algún otro metabolito formado desde el ácido glioxílico en otra vía metabólica.

Para desarrollar esta investigación se utilizan secciones histológicas de 10 μ m de espesor procedentes de diversas regiones del cerebro (áreas prefrontal, frontoparietal, temporal y occipital) y núcleos subcorticales, cerebelo y médula oblongada de grupos de cinco ratas cada uno, perfundidas vía arteria aorta, primero con 100 ml de una solución de NaCl del 0,9% y posteriormente con 300 ml de una solución fijadora de paraformaldehído del 4% (w/v) en 0,1 M de tampón fosfato (PB), pH 7, previamente anestesiadas por vía intraperitoneal con Equitesin (Jansen lab. U.S.A.) (60 mg. Kg⁻¹).

La composición del Equitesín es:

- Pentobarbital. 0,977 gr en 11,5 ml de alcohol de 90%.

- Hidrato de cloral. 4,25 gr en 42,8 ml de propilenglicol o propano, 1-2, diol.
- Sulfato de magnesio. 2,126 gr en 25 ml de H₂O destilada
- Añadir H₂O destilada hasta 100 ml. Neutralizar la solución y conservar protegida de la luz.

Las secciones histológicas fueron obtenidas con microtomo de congelación Leitz. En estos grupos de ratas la perfusión fijadora se realizó durante unos 30 min, al cabo de los cuales los cerebros fueron extraídos de la caja craneal, y luego fueron postfijados durante 3 horas a 4° C con el mismo fijador. Esos cerebros fueron luego lavados durante toda la noche con tampón fosfato 0,1 M, pH 7, en frigorífico a 4-8 °C. Pasado ese tiempo, se obtuvieron las secciones histológicas, realizando 3 lavados de las mismas de 30 minutos cada uno con tampón fosfato (PB) 0,1 M, pH 7.

Otros grupos de ratas fueron igualmente anestesiadas con Equitesin, pero no perfundidas con fijador. Esas ratas fueron decapitadas y los cerebros fueron extraídos y enfriados mediante inmersión en nitrógeno líquido, y secciones de 5 μm fueron obtenidas con un criostato (American Optical Corporation U.S.A.) a -25 °C.

Todas estas investigaciones han sido llevadas a cabo sobre secciones histológicas procedentes de ratas macho Wistar de 10 días de edad, 30 días de edad y 1 año de edad (lotes de 5 ratas por cada edad y por duplicado).

Medios histoquímicos

Las secciones histológicas de ambos grupos de ratas fueron incubadas durante 30 y 15 minutos, respectivamente, a 37°C en los siguientes medios histoquímicos:

Medio I

Ácido Glioxílico, sal sódica (Sigma Chem.)	10,0mM
Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma Chem.)	0,6 mM
Nicotinamide adenine dinucleotide (? -NAD) (Sigma Chem.)	1,5 mM
Tampon Fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4	X ml

Medio II

Ácido Glioxílico, sal sódica	10,0mM
NBT	0,6 mM
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (? -NADP) (Sigma Chem.)	1,5 mM
PB 0,1 M, pH 7,4	X ml

Medio III

Ácido Glioxílico, sal sódica	10,0mM
NBT	0,6 mM
PB 0,1 M, pH 7,4	X ml

Medio IV

NBT	0,6 mM
? -NAD	1,5 mM
PB 0,1 M, pH 7,4	X ml

Medio V

Ácido Glioxílico, sal sódica	10,0mM
NBT	0,6 mM
? -NAD	1,5 mM
PB 0,1 M, pH 7,4	X ml
Oxalacetato sódico (Sigma Chem.)	10,0mM

En este caso las secciones histológicas fueron preincubadas durante 15 minutos, a 37° C, en una solución de oxalacetato sódico 10,0 mM, pH 7

Medio VI

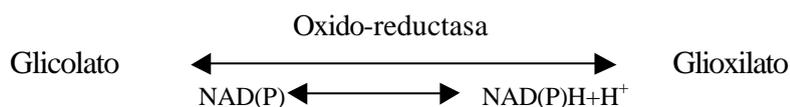
Ácido Glioxílico, sal sódica	10,0mM
NBT	0,6 mM
?-NAD	1'5 mM
PB 0,1 M, pH 7,4	X ml
Ácido oxámico, sal sódica (Fluka Chem.)	30,0mM

En este caso las secciones histológicas fueron preincubadas durante 15 minutos, a 37°C, en una solución 30,0 mM de sal sódica de ácido oxámico de pH 7.

Los medios I y II fueron utilizados para investigar la actividad deshidrogenasa directa sobre el ácido glioxílico en presencia de ?-NAD y de ?-NADP respectivamente. Los medios III y IV fueron considerados como controles de dicha actividad. El medio V fue utilizado para determinar la actividad de la glioxilato deshidrogenasa en ausencia de actividades malato-sintetasa y malato-deshidrogenasa, ya que el oxalacetato es un inhibidor de dichas actividades. El medio VI fue empleado para revelar la actividad glioxilato deshidrogenasa sin intervención de la lactato-deshidrogenasa, enzima que puede actuar sobre el glioxilato. Este medio contiene ácido oxámico que es un inhinidor de la lactato-deshidrogenasa.

Las secciones histológicas después de incubadas fueron lavadas con tampón fosfato 0,1 M, pH 7, y luego deshidratadas con alcoholes de concentración creciente, aclaramiento con xilol y montaje con DPX.

Otras secciones histológicas, pertenecientes a los cerebros de los grupos de ratas de diferentes edades, fueron incubadas en otro medio (medio VII), en las mismas condiciones ya descritas para la glioxilato deshidrogenasa, para investigar la actividad de la enzima glicolato-glioxilato óxido reductasa y, por tanto, si el glicolato puede ser una fuente de síntesis de ácido glioxílico.



El medio de incubación, **Medio VII**, estaba constituido por:

Ácido Glicólico, sal sódica (Sigma Chem.)	10 mM
NBT	0,6 mM
?-NAD (o ?-NADP)	1'5 mM
PB 0,1 M, pH 7,4	X ml

Todos estos medios de incubación fueron preparados con arreglo a las directrices propuestas por Pearse (1980) para la investigación histoquímica de deshidrogenasas y oxidoreductasas NAD o NADP dependientes.

B.- Localización de moléculas originadas por Transaminación del ácido glioxílico

Para investigar la presencia de moléculas originadas como consecuencia de la transaminación entre el ácido glioxílico y moléculas aminadas hemos desarrollado el método inmunohistoquímico PAP (método Peroxidasa-antiperoxidasa: Sternberger, 1979).

Síntesis de la molécula inmunizante

De acuerdo con las investigaciones de Fields y Dixon (1971) y Dixon y Fields (1972), 1mg de Albúmina Bovina (BSA: Sigma Chem) fue incubada, durante 60 minutos a temperatura de 20° C, con 1 ml de una solución de pH 5,5 que contenía:

- ?? 2,0 M de acetato sódico (Sigma Chem.)
- ?? 0.4 M de ácido acético glacial
- ?? 0.2 M de glioxilato sódico
- ?? 5 mM de CuSO₄.

El conjugado o molécula inmunizante fue aislado mediante cromatografía de intercambio iónico.

Inmunización de animales

5 conejos albinos fueron inmunizados cada 3 semanas mediante múltiples inyecciones intradérmicas del conjugado o molécula inmunizante emulsionada con Adyuvante de Freund (completo la primera vez e incompleto las sucesivas). Tres meses después de la primera inmunización se obtuvo suero sanguíneo de los animales, que fue convenientemente testado.

Aislamiento o Purificación del antisuero

El suero de conejo obtenido se mantuvo a 50°C durante 1 hora con la finalidad de eliminar las proteasas presentes, que podrían ocasionar la degradación del anticuerpo. Posteriormente se enfrió a 5°C y se centrifugó a 4.500 r.p.m.

Las IgGs contra el complejo glioxilato-BSA se aislaron haciendo pasar el suero por una columna de sefarosa-4B, activada con CNBr, a la que se acopló el complejo glioxilato-BSA.

Varias concentraciones de los sueros (1:50 a 1:2.000) fueron testados en el método ELISA (Stoker y cols, 1981), en el método inmunodifusión y en el de Hodgson y cols. (1985). La actividad inmunológica fue testada contra

BSA, conjugado glioxilato-BSA, tiroglobulina y conjugado tiroglobulina-glioxilato (este último conjugado fue sintetizado lo mismo que el BSA-glioxilato).

Como controles se utilizaron sueros de conejos no inmunizados frente al complejo glioxilato-BSA y sueros de conejos inmunizados contra el complejo glioxilato-BSA, pero después de hacerlos pasar a través de una columna de sefarosa, activada con CNBr, a la que se acopló el complejo glioxilato-BSA.

Los test de ELISA e inmunodifusión son bien conocidos y no necesitan ser descritos. El test de Hodgson y cols. (1985), en cambio, interesa ya que testa un antisuero en unas condiciones muy semejantes a las que se desarrollan en el medio inmunohistoquímico.

TEST DE HODGSON (Técnica de Dot Blot)

- 1) Incubar 1 noche tiras de papel de nitrocelulosa en solución de Poli-L-lisina (100 µg/ml) a temperatura ambiente.
- 2) Lavar 3 veces (10 min cada vez) con agua destilada.
- 3) Tratar 60 min con solución del 10% de glutaraldehído en tampón NaOH-KCl 0.2 M (pH=10).
- 4) Lavar tres veces (10 min cada vez) con el mismo tampón.
- 5) Lavar tres veces (10 min cada vez) con H₂O destilada.
- 6) Dejar secar.
- 7) Se depositan en las tiras de papel de nitrocelulosa 0.5 µl de los compuestos que se van a testar y se dejan secar
- 8) Tratar tres veces (10 min cada vez) con solución 0.1 M de L-lisina en tampón bicarbonato sódico pH=8.3-8.5.
- 9) Lavar 6 veces (5 min cada vez) con tampón fosfato 0,1M pH 7,4 que contenga TRIS (10 mM) y KCl (5.4 mM) (TPBS, pH=7.2-7.4).
- 10) Tratar las tiras de papel con la solución de gelatina (3%, p/v) y dejar secar.
- 11) Depositar 0.5 a 1 µl del antisuero diluido en TPBS o introducir las tiras enteras en la solución del antisuero, dejando reaccionar toda la noche a temperatura ambiente.
- 12) Lavar 6 veces (5 min cada vez) con TPBS.
- 13) Tratar con IgG anti-rabbit 1/30 durante 2 horas.
- 14) Lavar con TPBS (6 veces, 5 minutos cada vez).
- 15) Tratar con PAP-rabbit 1/50 durante 120 minutos.
- 16) Lavar con TPBS (6 veces, 5 minutos cada vez).
- 17) Tratar con solución DAB (diaminobencidina) 0.05% en tampón TRIS (50 mM, pH=7.4) durante 5 minutos.
- 18) Tratar durante 5 min con la solución de DAB que contenga 0.1% de H₂O₂.
- 19) Lavado

Reacción Inmunohistoquímica

A). Grupos de 5 ratas macho Wistar de 10, 30 y 365 días de edad fueron también anestesiadas con 60 mg/Kg de Equitesín (Jansen Lab. USA), mediante inyección intraperitoneal.

A continuación las ratas son perfundidas transcárdialmente, primero con solución 0,9% de NaCl y luego con una solución fijadora constituida por 4% de paraformaldehído en 0,1 M de PB, pH 7,4. El proceso de perfusión duró de 15 a 30 minutos.

B). Otros grupos de ratas de las edades mencionadas fueron igualmente anestesiadas y perfundidas, pero en estos grupos la solución fijadora estaba constituida por 4% de paraformaldehído, 0,1% de glutaraldehído y PB 0,1 M, pH 7,4.

Después de la fijación los cerebros fueron extraídos del cráneo y postfijados 4 horas a 4°C en solución fijadora que sólo contenía 4% de paraformaldehído en PB 0,1 M, pH 7,4.

C) Otros grupos de ratas fueron perfundidas como en A) y B), pero el tiempo de postfijación de los cerebros varió entre 14 horas y 15 días.

Pasado ese tiempo de postfijación los cerebros se dejaron toda la noche a 4° C en Tampón Fosfato Salino 0,1 M, pH 7,4 que contenía 2,3 M de sacarosa.

Secciones histológicas procedentes de las diversas regiones del cerebro, cerebelo y médula oblongada fueron obtenidas mediante un vibratomo o un microtomo de congelación. Las secciones de 10 a 20 μ m de espesor se lavaron 3 veces (20 minutos cada vez) con tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, y luego fueron procesados con arreglo al método inmunohistoquímico PAP (Sternberger y cols., 1979) de la manera siguiente:

- Las secciones histológicas se mantuvieron en suero normal de cabra, diluido en la proporción 1/50 en PBS durante 60 minutos y a temperatura ambiente. Se tira el suero de cabra sin lavar.
- Se incuban con el primer anticuerpo (suero purificado obtenido por nosotros), haciendo distintas diluciones: 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1000, manteniéndolas en cámara fría y agitación durante 12 a 24 horas.
- Lavar con PBS tres veces durante 15 minutos cada vez.

- Incubar durante 2 horas con el segundo anticuerpo (cabra-anticonejo) con dilución 1/50 en PBS.
- Lavar con PBS tres veces durante 15 minutos cada vez.
- Incubar con PAP-rabbit diluido 1/300 en PBS durante 2 horas.
- Lavar con PBS tres veces durante 15 minutos cada vez.
- Preincubar 10 minutos en DAB (6 mg) + PBS (10 ml).
- Incubar entre 5 y 10 minutos en una solución que contenga:

?? 3 mg de DAB.

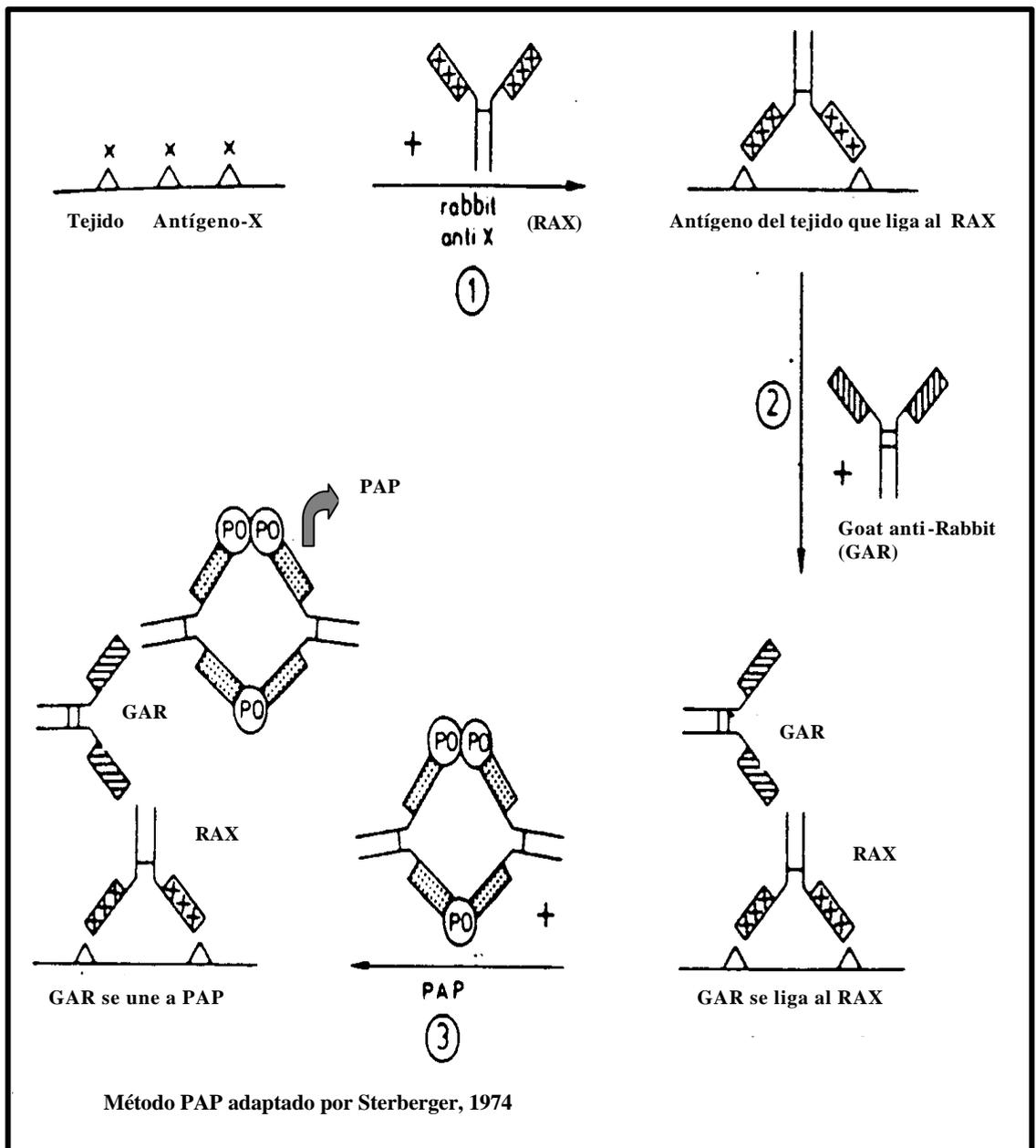
?? 5 ml de PBS

?? 0,01 ml de una solución hecha con 1ml de H₂O₂
(100%) en 9 ml de H₂O destilada.

Cuando se aprecia la reacción inmunológica en las secciones histológicas, que suele producirse entre 5 y 10 minutos, se para la reacción lavando con PBS.

Las secciones se deshidratan con alcoholes de concentración creciente y luego se montan en bálamo de Canadá para su observación con el microscopio óptico.

ESQUEMA DEL MÉTODO PAP (peroxidasa-antiperoxidasa)

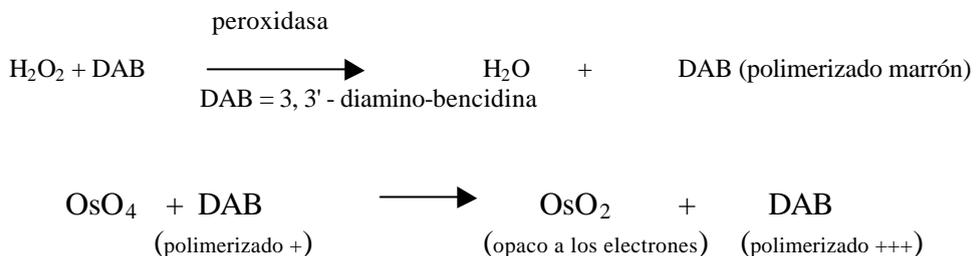


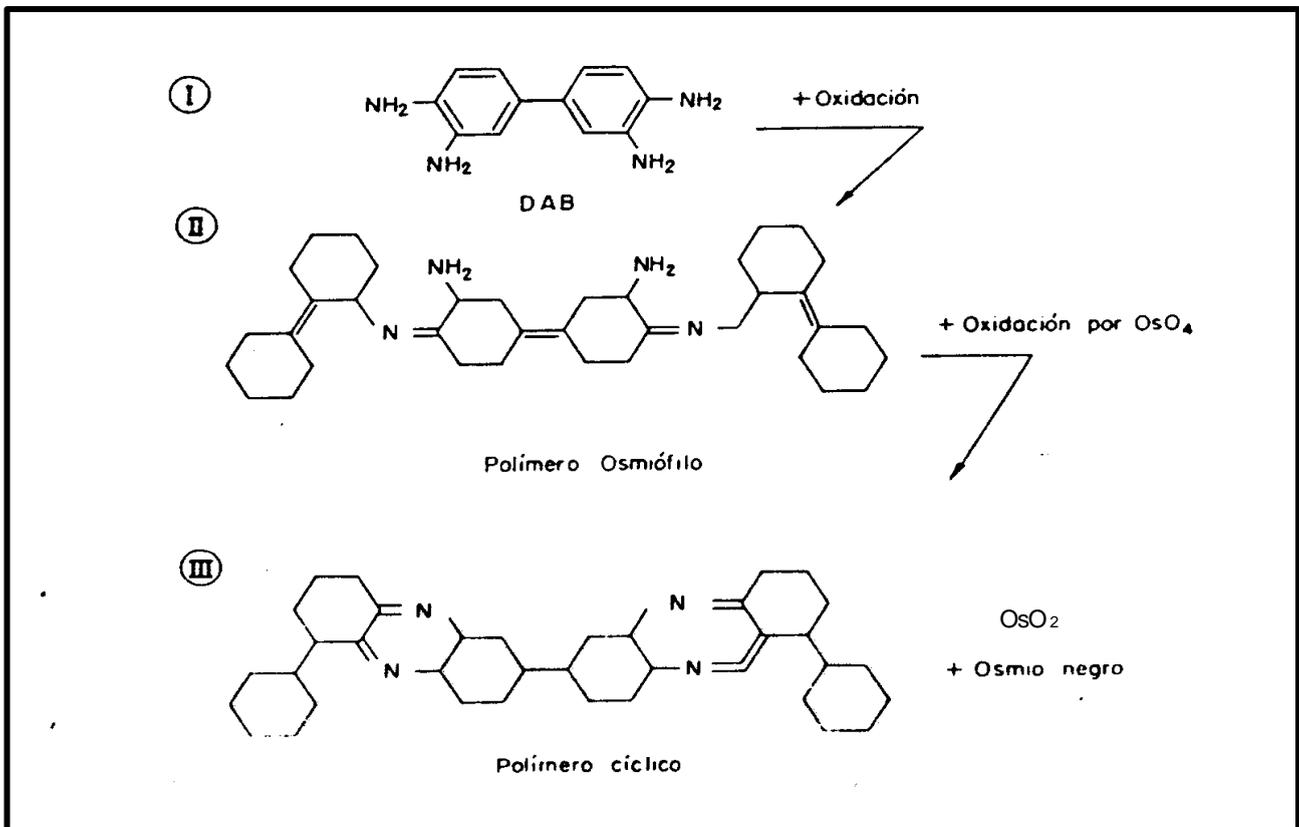
Como se ve en el esquema, los antígenos específicos en las secciones histológicas se localizan mediante la aplicación del antisuero preparado contra dicho antígeno y procedente del conejo. A continuación se incuban con anticuerpo de cabra-anticonejo, que formará un segundo acoplamiento.

El complejo PAP se une al segundo anticuerpo, formándose una macromolécula en el lugar del tejido, donde se encuentra el antígeno.

La peroxidasa del complejo PAP reacciona con H_2O_2 y el DAB (diaminobencidina), formándose polímeros que se ven como precipitados de color marrón en el microscopio óptico. Dicha polimerización se incrementa por oxidación en presencia de OsO_4 , originándose a su vez OsO_2 , opaco a los electrones, necesario para la buena visualización con el microscopio electrónico

Dicha reacción tiene lugar de la siguiente manera:





Secciones control fueron procesadas con el mismo método PAP, pero con las modificaciones siguientes:

- Incubación de las secciones con suero no inmunizado de conejo, en vez del suero de conejos inmunizados.
- Incubación de las secciones con suero de conejo anti-BSA (Sigma Chem.) en vez del suero específico.
- Secciones procesadas sin ser incubadas con el suero específico.

Para realizar la investigación inmunohistoquímica a nivel de Microscopía Electrónica, las secciones fueron post-tratadas, 1 hora a temperatura ambiente, con solución 1% tetraóxido de osmio, y luego deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol, conteniendo 1% de acetato de uranilo el etanol del 70%. Después de que las secciones fueron tratadas con etanol del 100%, ellas fueron embebidas en araldita (Fluka Chemic. AG) y luego cortadas con ultramicrotomo LKB III, obteniéndose secciones semifinas (2 μ m.) que fueron examinadas con microscopio óptico. Las partes de las secciones semifinas, previamente teñidas con azul de toluidina, que mostraron interés al ser examinadas con el microscopio óptico, debido a que en ellas existía inmunoreacción, fueron seleccionadas y reembebidadas en araldita, obteniéndose, a partir de esos fragmentos, secciones ultrafinas que, después de contrastadas con solución de citrato de plomo, fueron vistas con el ultramicroscopio (Microscopio Electrónico JEOL JEM 1200 EXII). Otras secciones ultrafinas fueron examinadas sin haber sido contrastadas con citrato de plomo.

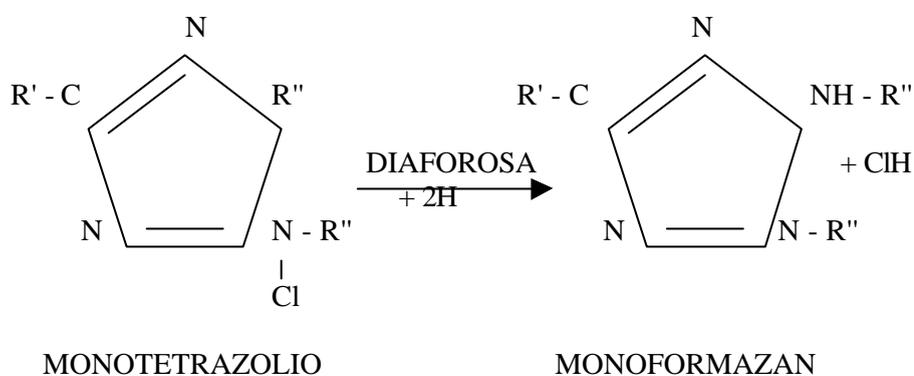
RESULTADOS

RESULTADOS

Reacciones Histoenzimológicas

Las propiedades biológicas de las sales de tetrazolio fueron descritas por primera vez en 1941 (Kuhn y Jerchel). Se trata de compuestos heterocíclicos solubles en agua y prácticamente incoloros cuando se encuentran en forma oxidada, pero que al reducirse se convierten en compuestos insolubles y coloreados llamados formazanes. Algunas de estas sales de tetrazolio pueden ser reducidas mediante sistemas biológicos, lo que las hace enormemente valiosas como reactivos en histoquímica para poner en evidencia la actividad de las enzimas deshidrogenasas.

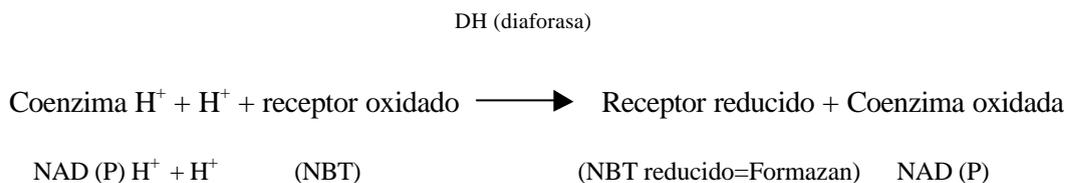
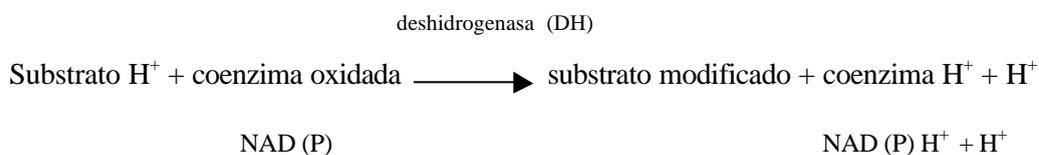
Las sales de tetrazolio derivan del tetrazolio o del di-tetrazolio. En el primer caso su reducción da origen a un monoformazan de color rojo y en el segundo a un di-formazan de color azul o violeta.



Dentro de los ditetrazolios está:

NBT= cloruro de 2,2'-di-p-nitrofenil-5-5'-difeníl-3,3'- (3,3'-dimetoxi-4-4'-bifenilene) - ditetrazolio, que es el ditetrazolio más usado en histoenzimología.

Reacción histoenzimológica positiva para glioxilato deshidrogenasa fue vista en forma de depósito coloreado azul-violeta (NBT reducido = Formazan) en las secciones histológicas en los medios I, V y VI, pero no en los restantes.



Esa reacción fue vista positiva en el S.N.C., tanto en los grupos de ratas perfijadas con solución de paraformaldehído como en las no fijadas y seccionadas con criostato. Dicha reacción fue vista también positiva en secciones procedentes de ratas de diversas edades, no encontrándose diferencias acusadas entre los distintos grupos de animales. Se demostró que esa reacción histoenzimológica positiva es NAD-dependiente, y que revela actividad deshidrogenasa exclusivamente dependiente de la acción directa de la enzima sobre solamente el ácido glioxílico, ya que dicha reacción positiva fue observada también en las secciones incubadas en presencia de inhibidores de las láctico y málico deshidrogenasas (oxalacetato inhibidor de la malato sintetasa y málico deshidrogenasa = Medio V, y ácido oxámico, inhibidor de la láctico deshidrogenasa = Medio VI).

Medio I	+	Medio IV	-
Medio II	-	Medio V	+
Medio III	-	Medio VI	+

La incubación de las secciones histológicas en el medio VII que contenía glicolato sódico, en vez de glioxilato sódico, β -NAD y NBT, no ocasionó reducción de NBT, lo cual indicó que no se mostró positiva la actividad glioxilato-glicolato oxidoreductasa.

Reacción histoquímica positiva, reveladora de actividad glioxilato-deshidrogenasa, fue vista en todas las regiones cerebrales estudiadas, tanto en la corteza cerebral como en los núcleos subcorticales, así como en el cerebelo y en los núcleos de la médula oblongada.

En la corteza cerebral esta reacción fue encontrada positiva en abundantes neuronas situadas tanto en la corteza prefrontal como en las cortezas frontoparietal, temporal y occipital.

En la corteza prefrontal esta reacción positiva fue observada en todos los tipos morfológicos de neuronas situadas en todas las capas (de I a VI) de las diferentes áreas examinadas (medial prefrontal cortex y áreas 24, 25 y 32). La reacción se visualizó en el pericarion de neuronas piramidales y no piramidales, así como también en células gliales y en pared de capilares.

En las cortezas frontoparietal y temporal la reacción deshidrogenasa positiva fue vista especialmente intensa en neuronas dispersas de

las áreas motora, somatosensorial, cingulada y entorhinal, siendo dichas neuronas más abundantes en las capas III, V y VI. Dicha reacción fue visualizada en forma de finos precipitados de NBT reducido (formazan) localizados preferentemente en el pericarion y en las prolongaciones neuronales. También han sido encontradas pocas neuronas en las que la reacción positiva estaba localizada rodeando el pericarion neuronal y las prolongaciones. Asimismo, dicha reacción positiva fue observada asociada a células gliales y a pared de capilares.

En todas las áreas de la corteza occipital fueron observadas también abundantes y dispersas neuronas situadas preferentemente en las capas III a VI, provistas de reacción positiva para glioxilato-deshidrogenasa en el pericarion neuronal y en las prolongaciones. De modo análogo a lo observado en la corteza frontoparietal y en la temporal, aquí también hemos visto neuronas en las que el depósito de formazan estaba situado en el borde del pericarion y de las prolongaciones neuronales. También, al igual que en la corteza prefrontal, en la temporal y en la frontoparietal, en la occipital se observó reacción positiva en células gliales y en la pared de capilares.

En todas las regiones corticales estudiadas la mayor intensidad de la reacción fue encontrada en la capa III, en los denominados "barrel fields" = campos de barras.

La reacción histoquímica más intensamente positiva de la glioxilato-deshidrogenasa fue observada, sin embargo, en los núcleos subcorticales, pero con especial protagonismo en las neuronas de las siguientes estructuras nerviosas:

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| ?? Turbéculo olfatorio | ?? Hipocampo |
| ?? Núcleo accumbens | ?? Núcleos hipotalámicos |
| ?? Caudado-putamen | ?? Núcleos amigdalares |
| ?? Núcleos olfatorios | ?? Substancia nigra |
| ?? Islotes de Calleja | ?? Núcleos habenuares |
| ?? Núcleo de Meisner | |

En el cerebelo se observó reacción histoquímica positiva fuerte en la capa granular y menos intensa en las células de Purkinge, viéndose, en cambio, mucho más débil en la capa molecular y en las neuronas allí existentes (células cesto y estrelladas). En los núcleos cerebelosos centrales las neuronas allí presentes exhibieron una intensa reacción positiva de glioxilato deshidrogenasa.

En todos los núcleos de la médula oblongada sus neuronas mostraron también intensa actividad glioxilato deshidrogenasa representada por un denso depósito citoplasmático de formazan.

No se encontró en cambio reacción histoquímica positiva en las secciones histológicas incubadas con glicolato para investigar la actividad glicolato óxido-reductasa, lo que indicó que en las regiones cerebrales estudiadas no se produce síntesis de glioxilato a partir del glicolato por la acción de la glicolato óxido-reductasa.

Todos estos resultados fueron observados en todos los grupos de ratas estudiadas.

Los resultados de la investigación histoenzimológica de la Glioxilato-deshidrogenasa se representan gráficamente en las figuras 1-22

Reacción Inmunohistoquímica (= Reacción Inmunocitoquímica)

El estudio de los test de especificidad del antisuero, obtenido de conejos inmunizados contra el complejo glioxilato-BSA como consecuencia de un proceso de transaminación “*in vitro*”, reveló que dicho antisuero reaccionaba en los test de ELISA e inmunodifusión (Figs. 23) con BSA y con los conjugados BSA-glioxilato y tiroglobulina-glioxilato, pero no con tiroglobulina sola. Este hecho demostró que dicho antisuero contenía anticuerpos contra el hapteno, independientemente de la presencia de anticuerpos contra la proteína que se transaminó con el glioxilato (BSA) presente en el complejo usado en la inmunización. El test de ELISA demostró que el poder inmunológico de dicho antisuero se mostraba positivo en diluciones hasta 1:1000.

En el estudio del test de Hodgson (Fig. 24), realizado sobre tiras de papel de nitrocelulosa activadas con glutaraldehído, se observó que el antisuero reaccionaba inmunológicamente con BSA, con los complejos BSA-glioxilato y tiroglobulina-glioxilato, pero no con tiroglobulina no transaminada con glioxilato. Tampoco se observó reacción inmunológica positiva cuando el antisuero estudiado en este test había sido previamente preabsorbido haciéndolo pasar a través de una columna de sefarosa a la cual se había acoplado el conjugado BSA-glioxilato. En el test de Hodson la actividad inmunológica del antisuero se encontró también positiva hasta 1:1000.

En las observaciones realizadas a través de microscopía óptica en la región prefrontal del cerebro se encontró reacción inmunohistoquímica positiva, como consecuencia de una interacción entre un antisuero, obtenido a partir de una molécula consecutiva al desarrollo de un proceso de transaminación entre el ácido glioxílico y una molécula aminada, y una posible molécula semejante existente en estructuras neuronales, preferentemente en las capas corticales III, IV, V y VI del cortex prefrontal externo y del medial prefrontal cortex. El inmunoprecipitado fue visto en varios tipos neuronales, pero especialmente en neuronas de tamaño mediano multipolares o estrelladas. Se observaron dos tipos de inmunoprecipitados: una reacción granular fina, situada aparentemente sobre la membrana neuronal externa, o un precipitado más grueso, con aspecto de botones, situado también sobre la membrana neuronal. No se encontraron apreciablemente neuronas inmunopositivas en las áreas corticales 24, 25 y 32. Reacción inmunopositiva fue también observada en células gliales y en paredes de capilares. No se observaron reacciones inmunohistoquímicas positivas en las preparaciones control.

En secciones semifinas (de 2 μ m de espesor) obtenidas a partir de secciones histológicas procesadas con el método PAP y luego reincluidas en araldita y teñidas con azul de toluidina, la reacción inmunohistoquímica fue observada bajo dos aspectos: una reacción densa en forma de botones gruesos situados sobre la membrana del cuerpo neuronal, y una reacción visualizada en

forma de granulado más fino también situada en la periferia del cuerpo neuronal y de las prolongaciones citoplasmáticas. En algunas ocasiones se observó una intensa inmunoreacción asociada a células gliales y a las paredes capilares.

La observación con el microscopio electrónico reveló la presencia de reacción inmunopositiva en varios sitios sinápticos (vesículas sinápticas y membranas sinápticas). Las terminaciones nerviosas mostraron pues inmunodepositos, pero ellos también fueron observados en neurotúbulos presentes en fibras nerviosas amielínicas y mielínicas.

La reacción inmunohistoquímica en la corteza prefrontal está representada en las figuras 25-47.

En la corteza frontoparietal, la observación con el microscopio óptico demostró, al igual que en la corteza prefrontal, la presencia de reacción inmunopositiva en neuronas escasas y dispersas situadas principalmente en las capas corticales III a VI. Dichas neuronas presentan forma piramidal o estrellada, y estaban situadas en las áreas corticales cingulada, motora, somatosensorial y olfatoria. El producto de la reacción inmunocitoquímica se encontró preferentemente situado en la zona del perikarion neuronal y de las prolongaciones, así como también en algunas células gliales y en paredes de capilares.

En la observación con el microscopio electrónico la inmunoreacción, al igual que en la corteza prefrontal, se localizó en vesículas sinápticas situadas en terminaciones axónicas que sinaptan sobre el perikarion y dendritas neuronales. En las secciones control la inmunoreacción fue negativa.

La reacción inmunohistoquímica en la corteza frontoparietal puede observarse en las figuras 48-64.

En todas las áreas de la corteza temporal se observó, también, la presencia de reacción inmunohistoquímica en neuronas situadas en las capas III a VI, pero ella se vio especialmente intensa en la capa IV. La identificación de esta reacción en diferentes tipos morfológicos neuronales fue posible en relación con la investigación de su forma y tamaño, piramidales y no piramidales, observándose que estas últimas pertenecían a los tipos bipolar y estrellado o multipolar. En la mayoría de estas neuronas la reacción inmunopositiva se observó, en forma de granulaciones, especialmente intensa en la periferia del perikarion y de las prolongaciones neuronales, al igual que lo observado en las cortezas prefrontal y frontoparietal. El estudio de las secciones semifinas con el microscopio óptico demostró la presencia de inmunoprecipitados en la periferia de las neuronas. Estos inmunoprecipitados fueron observados en forma de pequeñas vesículas con centro claro u oscuro, que sugirieron su asociación a zonas sinápticas. El estudio de esas secciones semifinas con el microscopio

electrónico demostró la presencia de vesículas sinápticas inmunopositivas, y membranas neuronales sinápticas asimismo con reacción inmunocitoquímica positiva. Muchos de los axones vistos estaban situados en sinapsis de Gray tipo I, pero se observaron también vesículas sinápticas inmunopositivas en sinapsis simétricas. En las regiones control la reacción inmunocitoquímica fue negativa.

En contraste con lo observado en la corteza cerebral, las neuronas pertenecientes a la mayoría de los núcleos subcorticales estudiados nunca presentaron reacción inmunocitoquímica positiva.

Los resultados observados fueron también encontrados en todos los grupos de ratas estudiados.

Nuestra investigación realizada sobre el hipocampo reveló la existencia de muy escasas neuronas solamente en el estrato oriens y ninguna en las demás capas. La cantidad de dichas neuronas aumentó el doble en el presubiculum, subiculum y parasubiculum. En la región temporal, el hipocampo mostró escasas neuronas con reacción positiva en el estrato oriens de CA1, CA2, CA3 y CA4.

Las reacciones inmunohistoquímicas correspondientes a la corteza temporal e hipocampo puede verse en las figuras 65-86.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

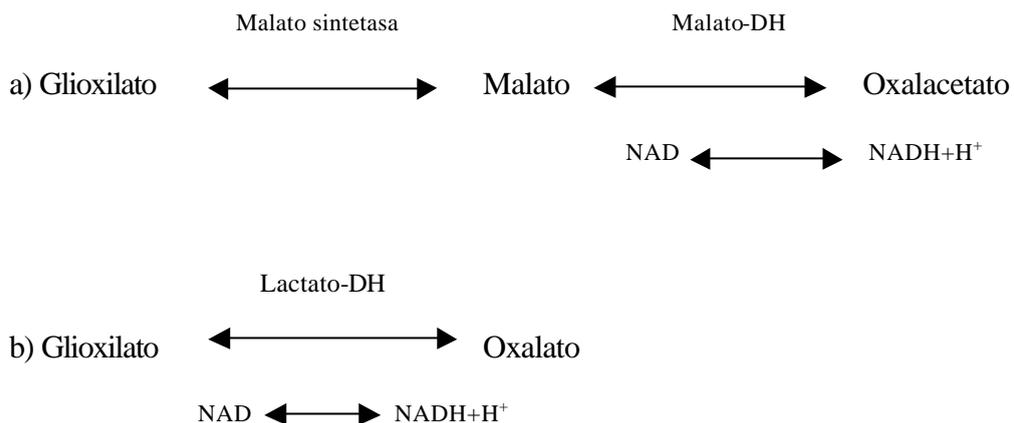
Los resultados encontrados en la presente investigación inducen que sean considerados los siguientes aspectos:

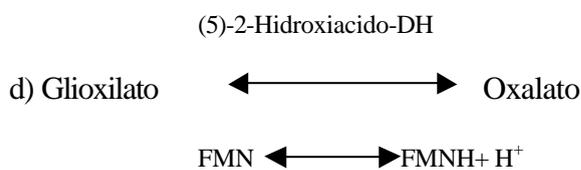
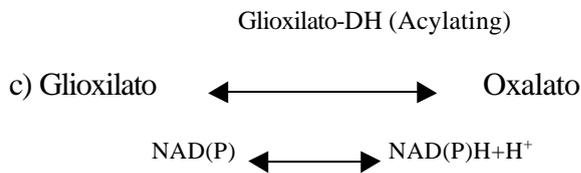
- a) Existencia en el Sistema Nervioso Central de mamíferos de diversas vías metabólicas que intervienen en el catabolismo del ácido glioxílico.
- b) Características de la localización de alguna de esas vías catabólicas.
- c) Significado de esas vías metabólicas en el funcionamiento del sistema nervioso.

Nuestra investigación histoquímica ha puesto de manifiesto la existencia de una reacción positiva (reducción de NBT) cuando secciones histológicas del cerebro de rata fueron incubadas en un medio histoquímico que contenía glioxilato sódico, β -NAD, pero no β -NADP, y un aceptor artificial de hidrógeno, como NBT. Debido a que la reacción histoquímica se observó siempre negativa cuando en el medio de incubación se reemplazó β -NAD por β -NADP, o cuando en el medio histoquímico faltaba glioxilato, se consideró que la reducción del NBT en el medio histoquímico es debida a la actividad de una deshidrogenasa sobre ácido glioxílico, y que esa deshidrogenasa en el curso de su actividad genera

?-NADH + H⁺, el cual transfiere sus H⁺ al NBT por la acción de una diaforasa, al igual que ocurre durante el desarrollo histoquímico de otras deshidrogenasas ?-NAD-dependientes, como ya ha sido descrito por Pearse (1980).

Varias investigaciones han demostrado que el ácido glioxílico puede ser catabolizado a través de diversas rutas metabólicas las cuales pueden ser examinadas en *Metabolic Biochemical Pathways*, Michel (1995) (Boehringer Mannheim). Algunas de esas vías se caracterizan por dar origen a NADH + H⁺ en presencia de una actividad enzimática óxido-reductora, que puede operar ya directamente sobre el glioxilato o indirectamente sobre algún metabolito derivado de él. Se considera que las siguientes reacciones enzimáticas son las rutas catabólicas más importantes del ácido glioxílico en las que intervienen deshidrogenasas





La observación de que la reducción del NBT siguió siendo positiva en las secciones incubadas en presencia de un inhibidor de la malato-DH (10 mM de oxalacetato: Hochster y Quastel, 1963) y de la lactato-DH (30 mM de oxamato: Bais y cols., 1989) nos demostró que dicha reducción era debida a la acción de una deshidrogenasa tipo gloxilato-DH, que actuaba directamente sobre el ácido gloxilico presente en el medio de incubación histoquímico, y que dicha gloxilato deshidrogenasa es NAD –pero no NADP- dependiente. Estos resultados coinciden con estudios previos de Martinez-Rodríguez y cols. (1996,1997); Capilla y cols (en prensa.)

La demostración de actividad gloxilato-DH en muchas neuronas presentes en diversas áreas de la corteza cerebral y en diversas capas corticales de esas áreas nos demuestra, sin lugar a dudas, que en esos lugares se sintetiza y

cataboliza ácido glioxílico, y que este metabolito debe intervenir en acciones muy importantes en el S.N. Por otra parte, el hecho de que las neuronas de los núcleos subcorticales estudiados exhiban mayor intensidad de actividad glioxilato-DH, debe hacer pensar que en esas neuronas su actividad funcional específica debe estar muy relacionada con el metabolismo del ácido glioxílico. Además, es interesante constatar que, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos no nerviosos, en el Sistema Nervioso Central el catabolismo del glioxilato por la acción de la glioxilato deshidrogenasa es NAD-dependiente como ya hemos mencionado.

Por otra parte, si se tiene en cuenta la alta reactividad del glioxilato para producir compuestos glioxilados por vía de una actividad transaminasa, enzimática o no enzimática (Bringmann y cols, 1992; Hanau y Berteilli, 1994; Martinez-Rodriguez y cols,1998), habría que pensar en la posibilidad de que se pudiera detectar alguna inmunoreactividad que manifestara la existencia de un pool especial del glioxilato, capaz de originar moléculas complejas como consecuencia de una transaminación “*in vivo*” entre el ácido glioxílico y moléculas aminadas.

La extensa e intensa actividad glioxilato deshidrogenasa que hemos observado sugiere que en el sistema nervioso este metabolito puede intervenir en numerosos procesos vitales. Así, Zocchi y cols. (1990) han

observado que el ácido glioxílico favorecen la supervivencia celular y la proliferación por su acción preservadora o mantenedora del pool de piridin nucleótido. Además, ha sido demostrado que el ácido glioxílico puede intervenir en otras funciones vitales como:

1. Síntesis de azúcares, aminoácidos y otros compuestos celulares, pudiendo actuar en una vía anaplerótica (Yamagihara y cols, 1984; Davis y cols, 1989; Masters, 1997).
2. Intervención en la síntesis de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento (Bradbury y Smyth, 1991)
3. Intervención en procesos de transaminación en los que el ácido glioxílico reacciona con moléculas aminadas. Este hecho ha sido demostrado por diversos autores:
 - Alanina-glioxilato aminotransferasa (Takada y cols, 1984; Wanders y cols, 1990; Andy y cols, 1995; Sakuraba y cols, 1996).
 - Asparagina-glioxilato aminotransferasa (Maul y Schuster, 1986).

- Glutamato-glioxilato aminotransferasa (Paszkowski y Niedzielska, 1989; Andy y cols, 1995).
- Serina-glioxilato aminotransferasa (Paszkowski y Niedzielska, 1990; Hagishita y cols, 1996).

Existen, por otra parte, numerosas evidencias que han sugerido, y sugieren, que el ácido glioxílico se condensa con aminas biógenas neuroactivas (noradrenalina, 5-hidróxitriptamina, dopamina) formando compuestos fluorescentes (Björklund y cols, 1972; Axelsson y cols, 1973). Este hecho ha inducido a la utilización con éxito del ácido glioxílico como sustancia fijadora o perfusora-fijadora del tejido nervioso para identificar las estructuras nerviosas aminérgicas, a nivel de la observación microscópica. Con este método se ha logrado localizar y diseñar con gran precisión vías nerviosas que utilizan aminas biógenas como neurotransmisores (Björklund y cols, 1972; Lindvall y Björklund, 1974; Borisova y cols, 1991; Warburton y Santer, 1994). Este hecho, es decir la constatación de que se formen estos compuestos, nos ha inducido a pensar en la posibilidad de poder localizar inmunohistoquímicamente la presencia de algún tipo de estas moléculas. Las investigaciones de Fields y Dixon (1971) y de Dixon y Fields (1972), en las que estos autores demostraron que el ácido glioxílico podía desarrollar reacciones no enzimáticas de transaminación “*in vitro*” con moléculas aminadas, motivaron la síntesis de un compuesto de transaminación entre el ácido glioxílico y albúmina bovina (BSA) con capacidad antigénica para la obtención de

anticuerpos que, luego, podían ser empleados en el método inmunohistoquímico para la localización de moléculas existentes en el tejido nervioso formadas allí previamente, en virtud de un proceso enzimático de transaminación (Martínez-Rodríguez y cols, 1997, 1998; Grajera y cols, 2000; Capilla y cols (en prensa)).

Los test de ELISA y Hodson (Stoker y cols, 1981; Hodgson y cols, 1985) han demostrado que el anticuerpo que ha obtenido nuestro grupo de trabajo (Martínez-Rodríguez y cols, 1997,1998; Grajera y cols, 2000; Capilla y cols (en prensa)) muestra gran especificidad, reaccionando positivamente con el complejo glioxilato-BSA, BSA y glioxilato-tiroglobulina, pero no con tiroglobulina no transaminada. Con la reacción inmunohistoquímica que hemos desarrollado, logramos determinar la existencia de inmunoreacción positiva en la periferia del citoplasma y de las prolongaciones de especiales neuronas dispersas en las capas de todas las áreas de la corteza cerebral de la rata. La observación con el microscopio electrónico reveló que la inmunoreacción se localiza preferentemente en las vesículas sinápticas y en membranas sinápticas.

El hecho de que la reacción inmunocitoquímica haya sido también localizada en células gliales, hace pensar en la posibilidad de que el anticuerpo, que hemos obtenido y utilizado en el método inmunohistoquímico, haya sido capaz de reaccionar con moléculas formadas “*in vivo*” en neuronas y en células gliales que intervengan coordinadamente en actividades nerviosas específicas.

Aunque ha sido hace tiempo demostrado que la neurotransmisión monoaminérgica ocurre en neuronas corticales (Lidov y cols, 1980; Lindvall y Björklund, 1983; Parnavelas y Mc. Donald, 1983) se desconoce si tales neuronas son realmente las que demuestra nuestro método histoquímico. En estos momentos estamos iniciando nuevas investigaciones conducentes a determinar la naturaleza exacta de la molécula o moléculas reveladas por el método inmunocitoquímico que hemos desarrollado, ya que el antígeno usado en el método inmunohistoquímico puede reaccionar con diversas moléculas que tengan grupos antigénicos comunes.

Si se considera que en general las vías nerviosas se deben formar o constituir entre neuronas que posean moléculas de adhesión químicamente análogas en su periferia (Edelman, 1990), es posible y probable que las neuronas aquí estudiadas, que poseen en su superficie moléculas originadas por transaminación entre ácido glioxílico y moléculas aminadas, constituyan especiales vías nerviosas que transmitan mensajes muy específicos. No sabemos sin embargo la naturaleza exacta de esas moléculas reveladas por nuestro método inmunohistoquímico, pero la localización inmunohistoquímica de las diversas transaminasas conocidas puede ayudar a resolver nuestra incógnita. También podría colaborar a la identificación de la estructura de la o las moléculas reveladas por nuestro anticuerpo el hecho de enfrentar dicho anticuerpo a fracciones de corteza cerebral aisladas electroforéticamente.

Las reacciones inmunohistoquímicas fueron observadas en la misma localización en todos los grupos de ratas estudiadas, y ello nos indica que las moléculas que reaccionan están presentes en la misma situación microscópica en las ratas de 10, 30 y 365 días de edad.

**INVESTIGACIÓN SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL GLIOXILATO VIA
GLIOXILATO-DESHIDROGENASA EN LOS PROCESOS DE ACTIVACIÓN
NEURONAL POR ACCIÓN DE LA NICOTINA.**

Introducción

La investigación de la posible intervención del ácido glioxílico en los procesos de activación de la función neuronal ha sido realizada ahora por nuestro grupo de trabajo, comparando los resultados obtenidos con los observados en investigaciones previas en los que ya hemos demostrado que esta molécula es metabolizada por diversas vías metabólicas (deshidrogenasas y transaminasas), en diversas áreas cerebrales de ratas normales no sometidas a procesos activadores de la función neuronal (Martínez-Rodríguez, et al, 1996, 1997; Grajera et al, 2000).

En la presente investigación, hemos estudiado la acción de la Nicotine Hidroxy Tartrate Salt (Sigma) como activador de la función neuronal y hemos determinado si la intensidad del metabolismo del ácido glioxílico, vía glioxilato-deshidrogenasa, se incrementa en comparación con la actividad de la glioxilato-deshidrogenasa en ratas no tratadas con la molécula nicotínica.

Los efectos de la nicotina sobre la actividad histoquímica de diversas deshidrogenasas pertenecientes a las vías glicolítica y del ciclo de Krebs

han demostrado (Turegano y cols., 2001) que la administración de esa molécula a ratas, en dosis de 2 a 4 mgs/Kg peso/día, ocasionaba un importante incremento de la actividad de las deshidrogenasas estudiadas (gliceraldehído-3-fosfato-DH, málico-DH, láctico-DH y succinato-DH), y ese hecho nos ha inducido a investigar si la nicotina produce también una acción activadora de la utilización del ácido glioxílico, vía glioxilato-deshidrogenasa, en la corteza cerebral de la rata.

Material y Métodos

Un grupo de 10 ratas Wistar macho de 350 gr de peso fueron tratadas con Nicotine Tartrate Salt (Sigma Chem., USA) mediante la implantación por vía subcutánea de una bomba osmótica ALZET (2 M L 2 Type Alza Corporation, Palo Alto, CA 94303), con 2 ml de una solución salina 0,9% w/v que contenía 7,5 mg de Nicotine Hidroxy Tartrate Salt. Dicha bomba suministró 5 μ l de la solución de nicotina cada hora, durante 15 días. A este grupo de ratas se las denominó ratas nicotínicas (NR).

A otro grupo de 10 ratas Wistar macho de 350 gr de peso se les administró, durante 15 días, 5 μ l cada hora de una solución de ClNa (0,9% w/v) carente de nicotine salt mediante otra bomba osmótica ALZET (2 M L 2 Type Alza Corporation, Palo Alto, CA 94303). A este grupo de ratas se las denominó ratas control (CR).

Después del tratamiento, ambos grupos de ratas fueron anestesiadas, por vía intraperitoneal con 60 mg/kg Equitesín (Jansen, Piscataway, NJ.) y luego perfundidas vía arteria aorta, primero con 150ml de una solución de NaCl (0,9% w/v) y luego con 300ml de tampón fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, que contenía 4% (w/v) de paraformaldehído. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se postfijaron durante 3 horas a 4°C con la misma solución fijadora, lavandolas

después durante toda la noche con tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4, que contenía 30 % de sacarosa. Al día siguiente, los cerebros fueron seccionados con microtomo de congelación obteniendo secciones histológicas de 10 μ m de espesor, que posteriormente fueron lavadas durante 20 minutos con PB.

Las secciones histológicas procedentes de las ratas tratadas y no tratadas con Nicotine Hidroxy Tartrate Salt fueron incubadas durante 15 y 30 minutos a 37 °C en los siguientes medios:

Medio I

- 10,0 mM glyoxylic acid, sodium salt (Sigma Chem.)
- 0,6 mM nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma Chem.)
- 1,5 mM nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD, Sigma Chem.)
- 0,1 M PB, pH 7,4.

Medio II

Tiene la misma composición que el medio I, pero con β -NADP, en vez de β -NAD.

Medio III

Su composición es la misma que la del medio I pero carece de β -NAD.

Medio IV

Tiene la misma composición que el medio I, pero carece de substrato (glyoxilic acid).

Medio V

Tiene la misma composición que el medio I, pero contiene además 10 mM de oxalacetato sodium salt (Sigma Chem.), inhibidor de la málico deshidrogenasa.

Medio VI

Su composición es la misma que la del medio I, pero contiene además 30 mM de oxamic acid sodium salt (Sigma Chem.), inhibidor de la láctico deshidrogenasa.

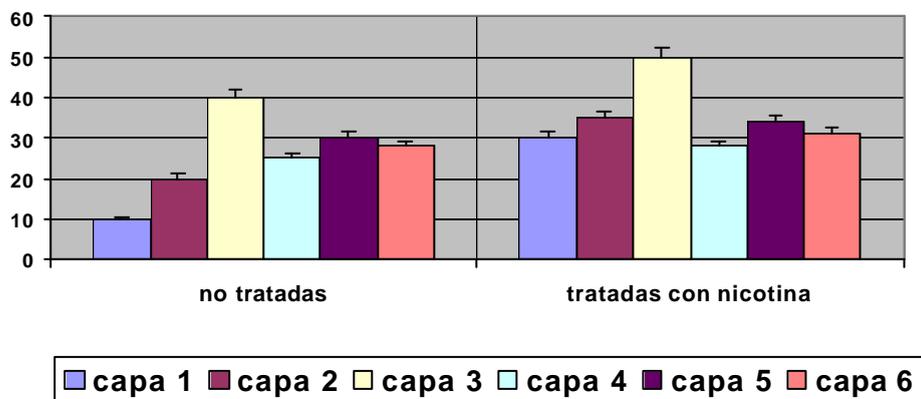
Después de la incubación, las secciones fueron lavadas y luego deshidratadas con alcoholes de concentración creciente (50%, 70%, 95% y 100%). Posteriormente fueron tratadas con xilol y montadas en DPX. Las secciones fueron luego examinadas con microscopio óptico y la intensidad de la reacción fue medida con un histofotómetro ZEISS, usando luz de 630 nm de longitud de onda.

Resultados

La observación microscópica de la corteza cerebral (áreas cingulada, motora, somatosensorial y enthorinal) reveló que la actividad glioxilato-DH presente en las secciones de los cerebros incubados en el medio histoquímico, procedentes de ratas tratadas con nicotina, presentaba una intensidad mayor que la observada en los cerebros de ratas normales no tratadas (Figs 86, 87, 88 y 89).

El resultado de las medidas histofotométricas computerizadas reveló que en las ratas tratadas con nicotina la actividad glioxilato-DH superó en más de un 40% a la observada en la corteza cerebral de las ratas no tratadas, revelándose el mayor incremento en las capas I, II y III (ver gráfico).

Valores histofotométricos comparativos de la actividad histoquímica de la glioxilato-DH entre la corteza cerebral de ratas tratadas con nicotina y no tratadas



Estos resultados están de acuerdo con investigaciones previas de nuestro grupo de investigación, que han demostrado que la actividad histoquímica de diversas deshidrogenasas de la vía glicolítica (gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa y láctico-deshidrogenasa) y del ciclo de Krebs (succinato-deshidrogenasa y málico-deshidrogenasa) se incrementan en la corteza cerebral de las ratas tratadas con nicotina, especialmente en las capas I, II y III (Martínez-Rodríguez y cols., 1997; Turégano y cols., 2001). Esas observaciones revelan que el ácido glioxílico puede ser utilizado por las neuronas cuando ellas son activadas por la nicotina, en sus receptores nicotínicos colinérgicos, para suministrar la energía necesaria para formar moléculas de ATP. Por otra parte, es también posible que en los procesos de la activación de las neuronas colinérgicas sea necesaria una mayor síntesis de acetilcolina, la cual sería potenciada produciéndose una activación de la formación de actilCo-A.

Discusión

Nuestros resultados confirman observaciones previas (Martínez-Rodríguez y cols., 1996) en donde se demostró que el ácido glioxílico es catabolizado en la corteza cerebral, por la vía de la glioxilato deshidrogenasa (acylating), en una vía diferente de la que opera en otros órganos de mamíferos como riñón e hígado. En estos últimos órganos su actividad se desarrolla en presencia de β -NADP (Bais y cols., 1989; Davis y cols., 1989; Popov y cols., 1998), mientras que en la corteza cerebral se desarrolla en relación con β -NAD, pero no con β -NADP.

El ácido glioxílico podría también ser catabolizado por la málico deshidrogenasa y por la láctico deshidrogenasa, enzimas que actúan en presencia de β -NAD, pero nuestros resultados histoquímicos en la corteza cerebral confirman observaciones anteriores (Martínez-Rodríguez y cols., 1996) que demuestran que dichos resultados no dependen de la acción de esas enzimas, ya que la reacción histoquímica fue observada también positiva aún cuando las secciones histológicas hayan sido incubadas en presencia de inhibidores específicos de esas enzimas.

Al igual de lo que ya ha sido observado previamente (Turegano y cols., 2001) con respecto a investigaciones realizadas sobre la acción de la nicotina sobre las actividades de varias deshidrogenasas de la vía glicolítica y del ciclo de

Krebs, nuestra investigación histoquímica ha demostrado que en la corteza cerebral de las ratas tratadas también con nicotina se produce igualmente un incremento intenso de la actividad de la glioxilato deshidrogenasa en las capas I, II y III.

Investigaciones llevadas a cabo por Grenhoff y cols (1986) han demostrado que la nicotina ejerce su acción sobre el sistema nervioso central por medio de varios mecanismos neurotransmisores. La nicotina actúa sobre los vasos sanguíneos y neuronas corticales (Gitelman y Prohovnik, 1992; Domino y cols, 2000), activando especialmente los receptores nicotínicos colinérgicos situados allí (Kalaria y cols, 1994; Riekkinen y cols, 1993). Esa activación neuronal producida por la nicotina ocasiona un incremento de los procesos de neurotransmisión, para lo cual es necesario que ocurra un aumento de la producción de energía, que se origina mediante la activación de los procesos metabólicos glicolíticos y del ciclo de Krebs (Mc Ilwain, 1966; Sokoloff, 1981; Blin y cols., 1994). Es ya conocido que la energía necesaria para la producción del transporte de iones durante el proceso de neurotransmisión depende preferentemente de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa sobre el ATP (Sokoloff, 1981).

Investigaciones pioneras de Ramón y Cajal (1890, 1911 y 1912), Retzius (1895) y posteriores de Lorente No (1949) y Marín Padilla (1984) han establecido la estructura microscópica de las capas I, II y III de la corteza cerebral,

y se ha considerado que ellas poseen un gran número de sinapsis, pero en el momento presente se conoce poco sobre su papel en los procesos de aprendizaje y memoria. Se ha demostrado que una gran parte de las fibras nerviosas de esas capas son de naturaleza monoaminérgica que proceden de neuronas monoaminérgicas situadas en el hipocampo, sustancia nigra y núcleos de Meissner, caudado-putamen, accumbens y amigdaloides, neuronas que poseen receptores nicotínicos colinérgicos (Kulak y cols, 1997). La nicotina, por lo tanto, puede activar esas neuronas y proyectar la actividad neurotransmisora monoaminérgica a las capas corticales I, II y III, y eso explicaría el incremento de la actividad de las deshidrogenasas involucradas en el aumento de ATP y del movimiento iónico en las sinapsis de esas capas corticales.

En nuestra investigación se pone en evidencia que el incremento de la actividad de la glioxilato deshidrogenasa se produce por la acción de la nicotina, y que, por lo tanto, el catabolismo del ácido glioxílico puede estar también involucrado en el incremento de la producción de energía durante la activación de los fenómenos de neurotransmisión.

PROYECTOS FUTUROS DE INVESTIGACIÓN A DESARROLLAR EN
RELACIÓN CON LOS HECHOS OBSERVADOS

1° Identificación de la o las moléculas que reaccionan inmunológicamente con el anticuerpo obtenido por transaminación "in vitro" entre ácido glioxílico y BSA.

Esta investigación se desarrollará sobre fracciones aisladas electroforéticamente a partir de homogenados de fracciones subcelulares de corteza cerebral de rata.

2° Identificación de las subfracciones que reaccionan con el anticuerpo.

3° Estudio inmunohistoquímico de las diversas glioxalato-transaminasas conocidas para determinar si alguna de ellas presenta la misma localización que la observada con nuestro anticuerpo.

4° Investigación inmunohistoquímica de la distribución de las neuronas identificadas con nuestro anticuerpo en diversos estados experimentales (activadores y bloqueadores de los diversos tipos de neurotransmisión).

FIGURAS

GLIOXILATO DESHIDROGENASA

Fig. 1.- Glioxilato deshidrogenasa. Corteza prefrontal incubada en medio histoquímico en presencia de β -NADP en vez de β -NAD (medio II). Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig. 2: Glioxilato deshidrogenasa. Corteza prefrontal incubada en medio histoquímico carente de glioxilato sódico (medio IV). Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig. 3: Glioxilato deshidrogenasa. Corteza frontoparietal incubada en medio histoquímico en presencia de β -NADP en vez de β -NAD (medio II). Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig. 4: Glioxilato deshidrogenasa. Corteza frontoparietal incubada en medio histoquímico carente de glioxilato sódico (medio IV). Escala de barras = 80,5 μ m.

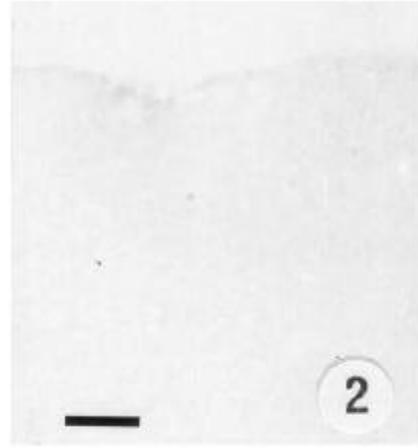


Fig. 5: Glioxilato deshidrogenasa. Corteza temporal, sección incubada en medio histoquímico en presencia de β -NADP en vez de β -NAD (medio II). Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig 6: Glioxilato deshidrogenasa. Corteza temporal, sección incubada en medio histoquímico carente de glioxilato sódico (medio IV). Escala de barras = 80,5 μ m.



Fig. 7: Glioxilato deshidrogenasa. Corte histológico de región prefrontal incubada. La máxima intensidad de la reacción puede observarse en la capa 3, en las denominadas "barrel fields" (bf)= campo de barras = 80,5 μ m.

Fig. 8: Glioxilato deshidrogenasa. Corteza frontoparietal. La localización de la actividad zimática se sitúa en la misma localización, en referencia a las capas corticales, que en la corteza prefrontal. El campo de barras situado en la capa cortical 3 está marcado por un asterisco. También se observa reacción intensa positiva en el caudado putamen (cp). Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig. 9: Glioxilato deshidrogenasa. Se observa actividad deshidrogenasa positiva en diversos tipos neuronales de las distintas capas de la corteza prefrontal. Escala de barras = 60,2 μ m. Esta figura puede transponerse a las diversas capas neuronales, aún cuando la densidad de neuronas positivas es más intensa en las capas 3 y 5.

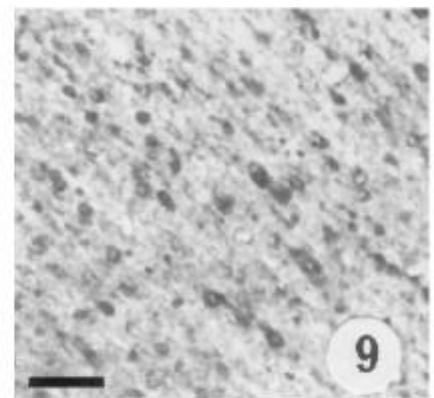
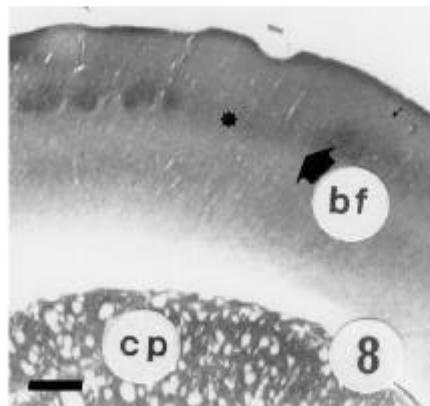
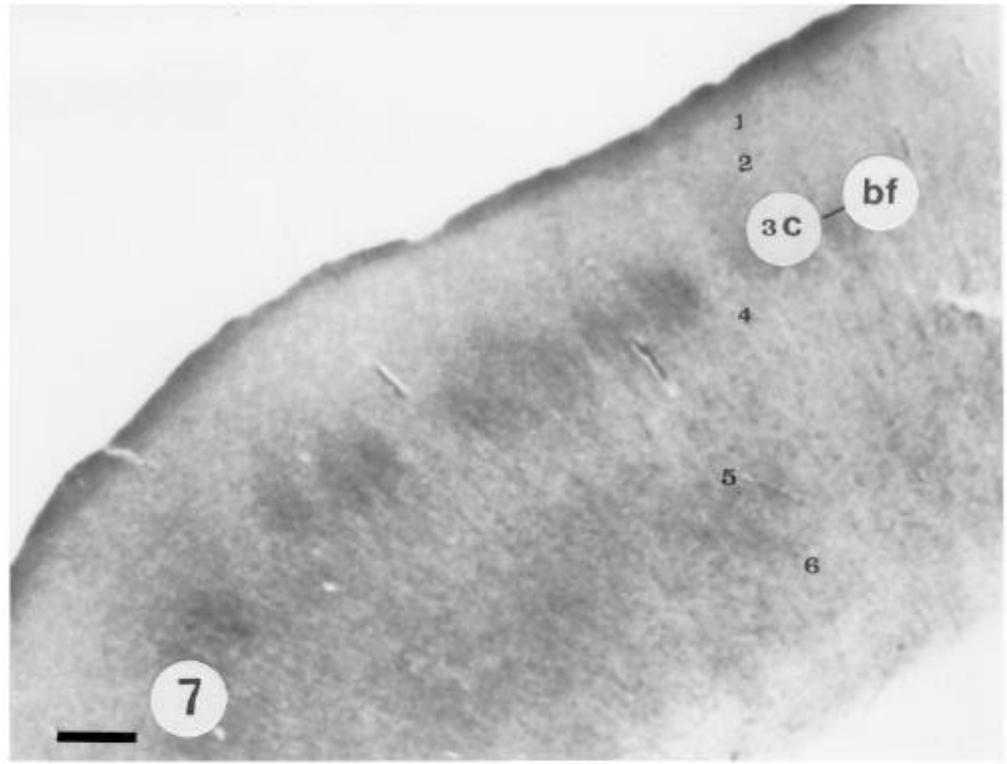


Fig. 10: Glioxilato deshidrogenasa. Se observa reacción histoquímica intensa en neuronas de la 5ª y 6ª capas de la corteza cerebral (cc) y en el caudado putamen (cp). El campo de barras (bf) está situado en la capa 3. Actividad glioxilato deshidrogenasa menos intensa se demuestra en las restantes capas corticales. Escala de barras = 80,5 μ m.

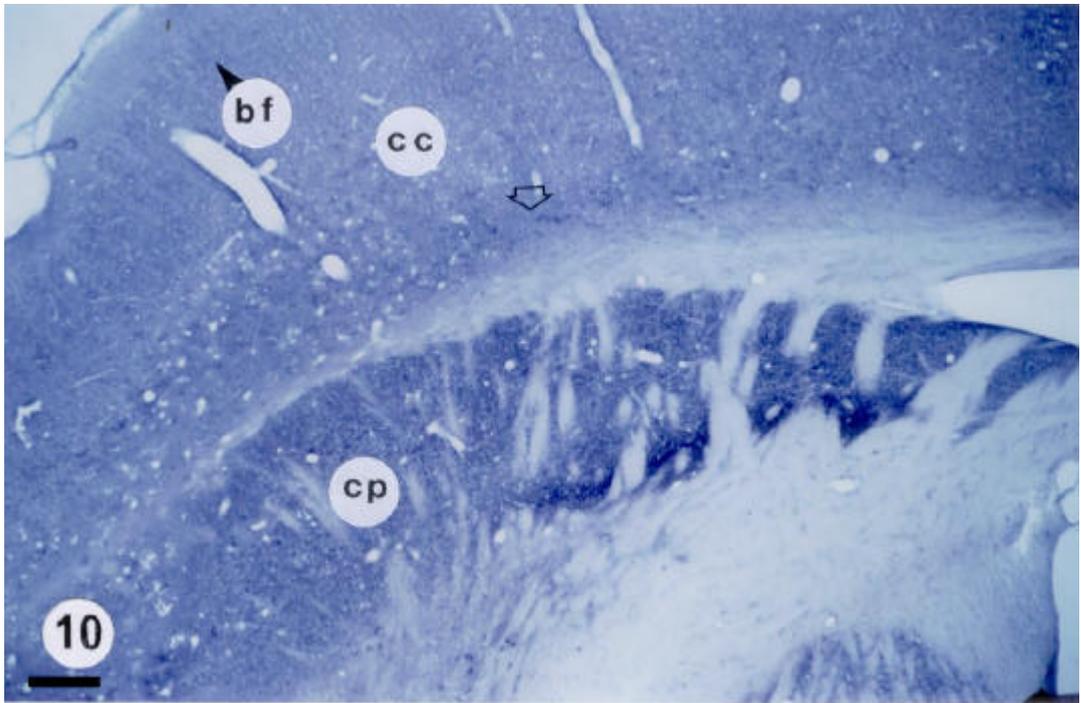


Fig. 11: Glioxilato deshidrogenasa. Se observa actividad glioxilato deshidrogenasa muy intensa en neuronas del núcleo de Meissner (nM) y en el caudado putamen (cp). Escala de barras = 60,2 μ m.

Fig. 12: Glioxilato deshidrogenasa. Región hipotálamo-quiasmática. Se observa actividad intensa de esta enzima en neuronas del sistema perivascular (snp) situadas en el quiasma óptico (Q). Escala de barras = 60,2 μ m.

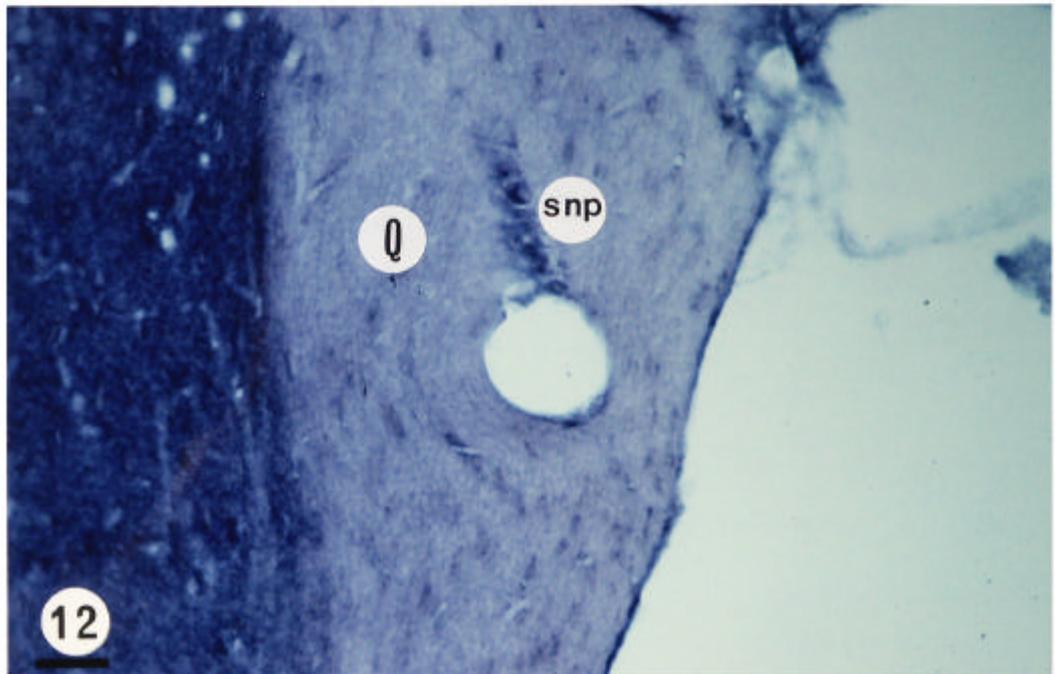
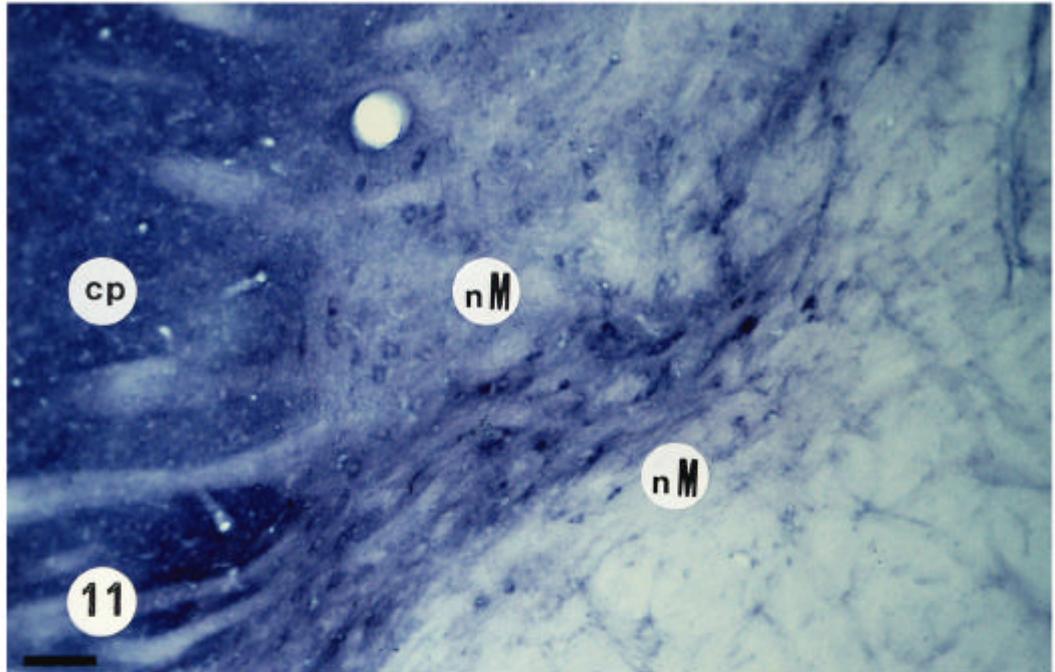


Fig. 13: Glioxilato deshidrogenasa. Región hipotalámica. Se observa intensa reacción positiva en las neuronas de los núcleos supraóptico (nSO) y paraventricular (nPV). Q= quiasma óptico, 3V= 3^{er} ventrículo. Escala de barras = 80,5 μ m.

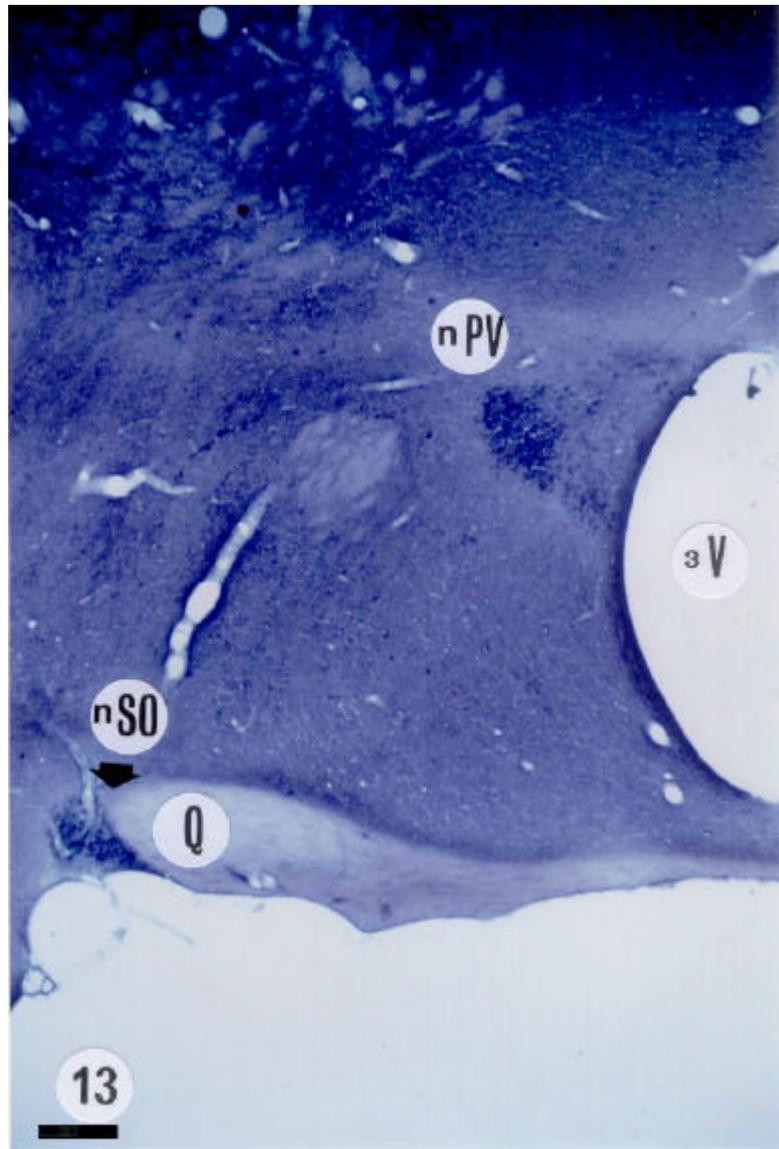


Fig. 14: Glioxilato deshidrogenasa. Se observa intensa reacción positiva en neuronas de los núcleos de Meissner (nM), supraóptico (nSO) y amigdalino (nA). Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig.15: Glioxilato deshidrogenasa. Se observa intensa reacción positiva en neuronas perifornicales (nPF). F= Fornix. Escala de barras = 60,2 μ m.

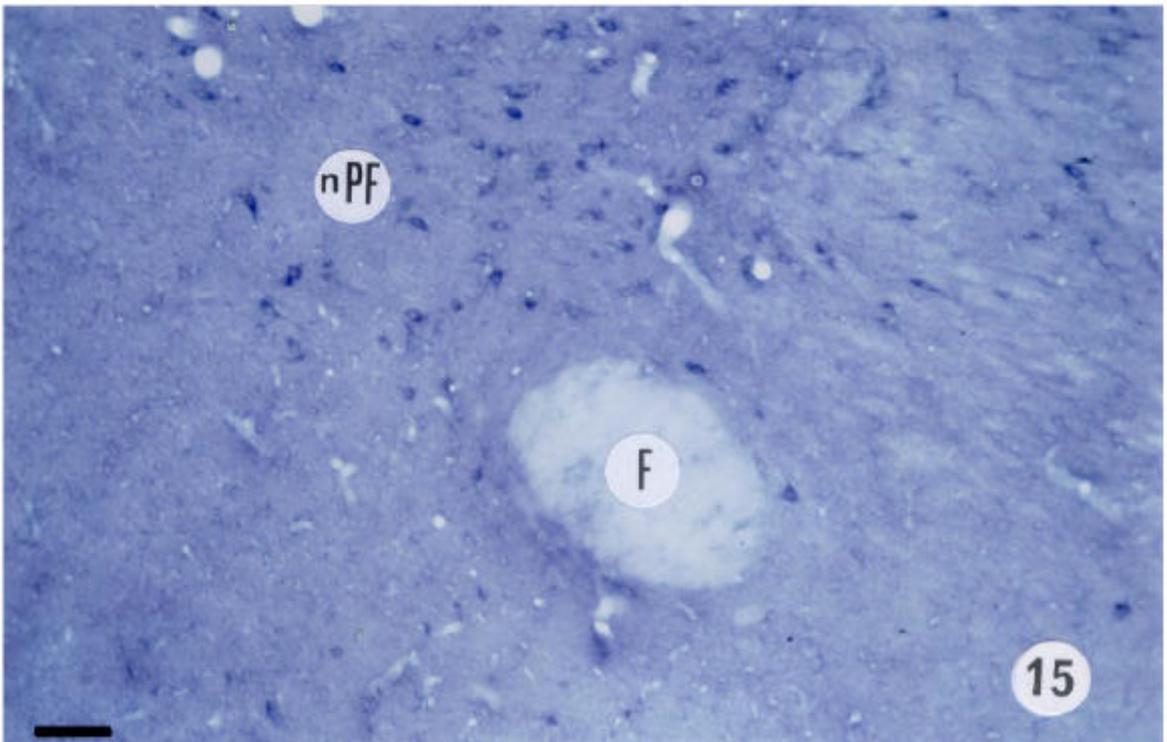
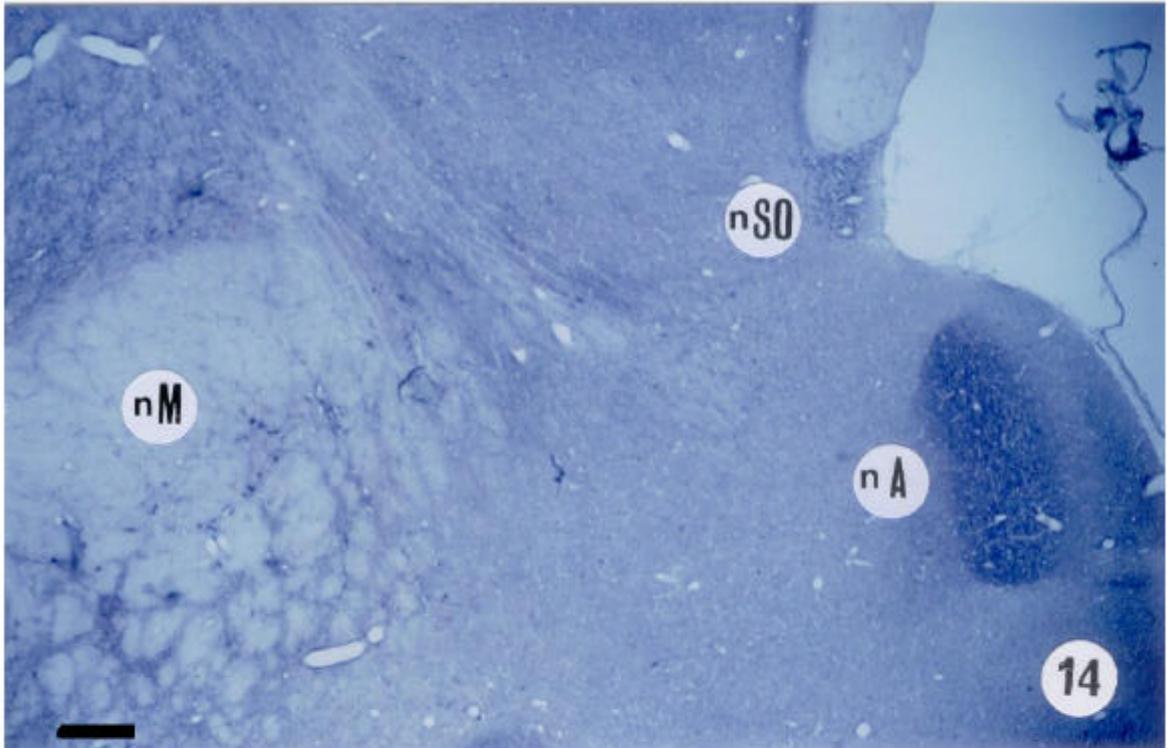


Fig. 16: Glioxilato deshidrogenasa. Región hipotalámica (H). Se observa intensa reacción positiva en neuronas del sistema neuronal perivascular (snp). Vaso capilar (V). Escala de barras = 60,2 μ m.

Fig. 17: Glioxilato deshidrogenasa. Región hipotalámica. Se observan neuronas con actividad positiva en núcleo paraventricular (pv), sistema perifornical (spf), sistema neuronal perivascular (snp) y núcleo supraóptico (so). Q = quiasma óptico. Escala de barras = 80,5 μ m.

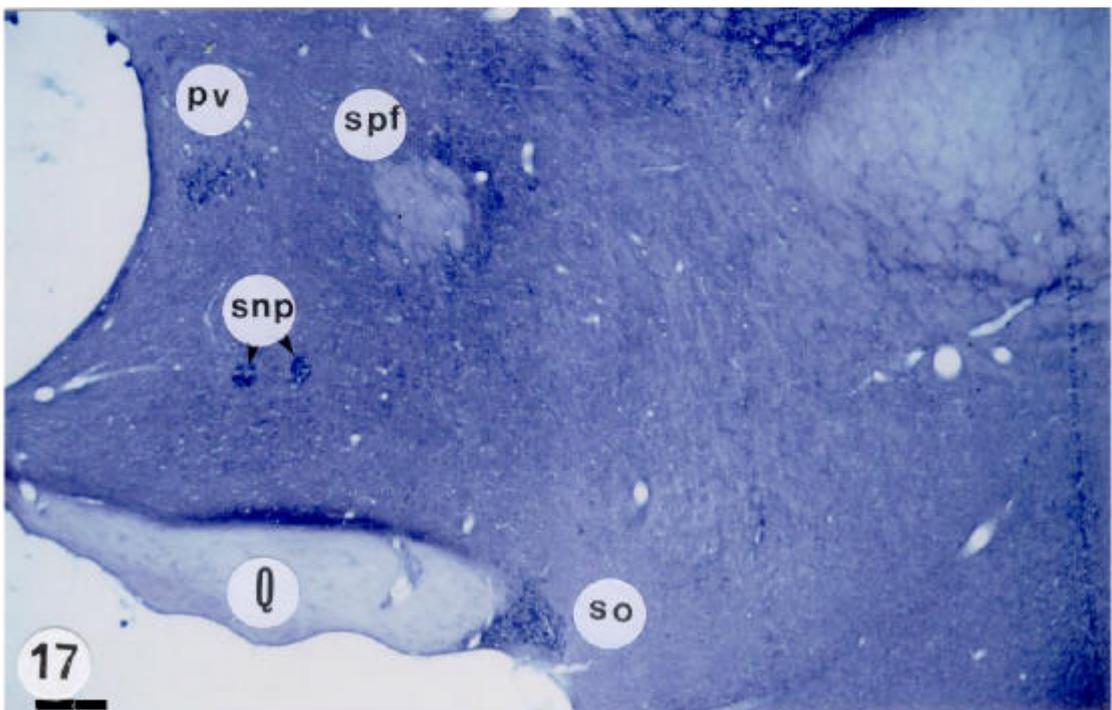
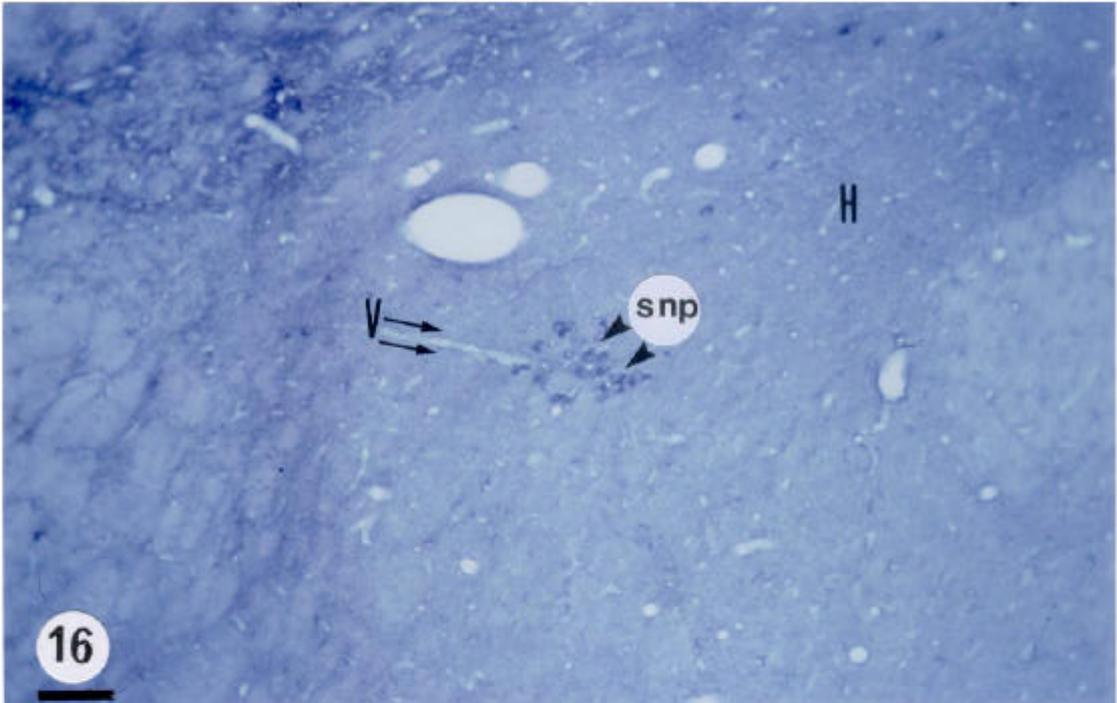


Fig. 18: Glioxilato deshidrogenasa. Cerebelo. Se observa intensa actividad especialmente en la zona granular (gr), y células de Purkinge (cp) y actividad menos intensa en la capa molecular (cm). Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig 19: Glioxilato deshidrogenasa. Cerebelo. La mayor intensidad de la reacción histoquímica se observa en las células gliales situadas en el límite entre la sustancia blanca y la capa granular (gr). Reacción positiva se observa también, pero con menos intensidad, en células de Purkinge (cp), e intensidad más débil en capa molecular (cm). Escala de barras = 80,5 μ m.

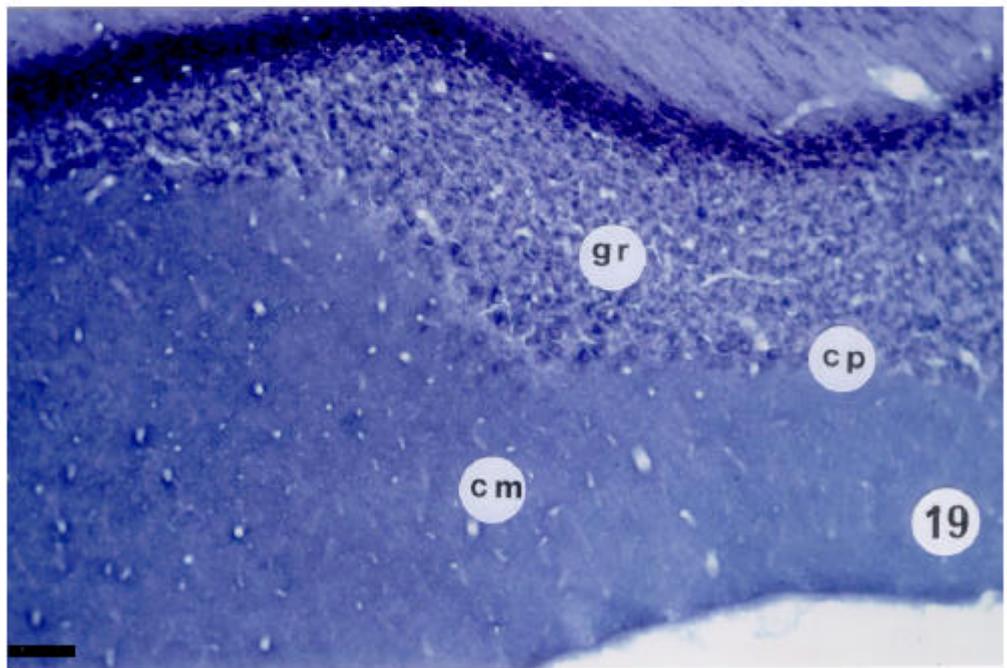
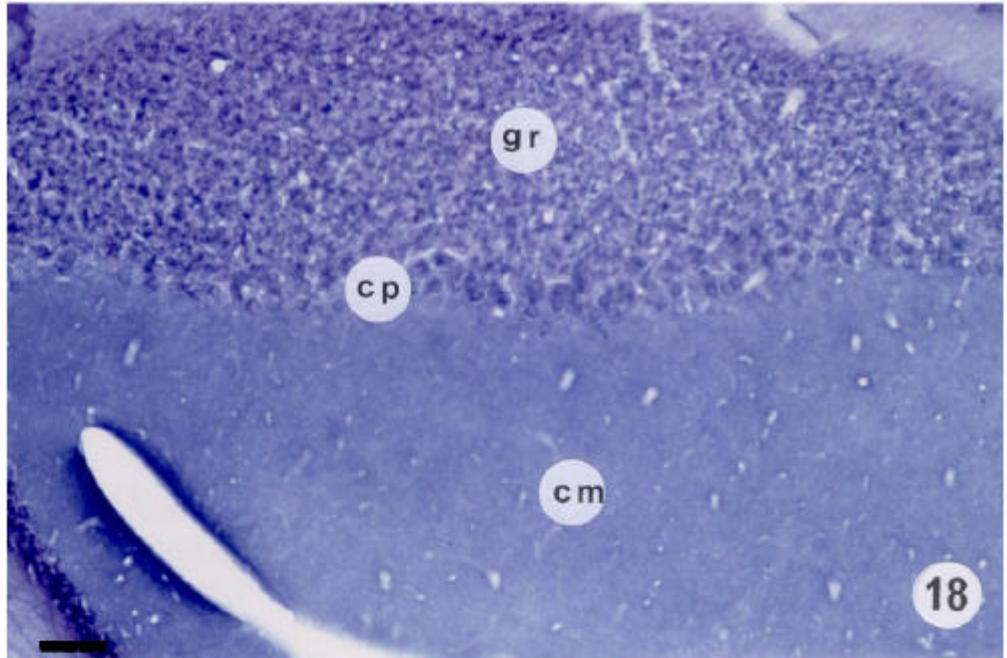


Fig. 20: Glioxilato deshidrogenasa. Médula Oblongada. Se observan neuronas con intensa actividad en núcleo coclear (nc), en núcleo facial (nf), en neuronas olivares (no) y en neuronas reticulares (nr). Escala de barras = 80,5 μ m.

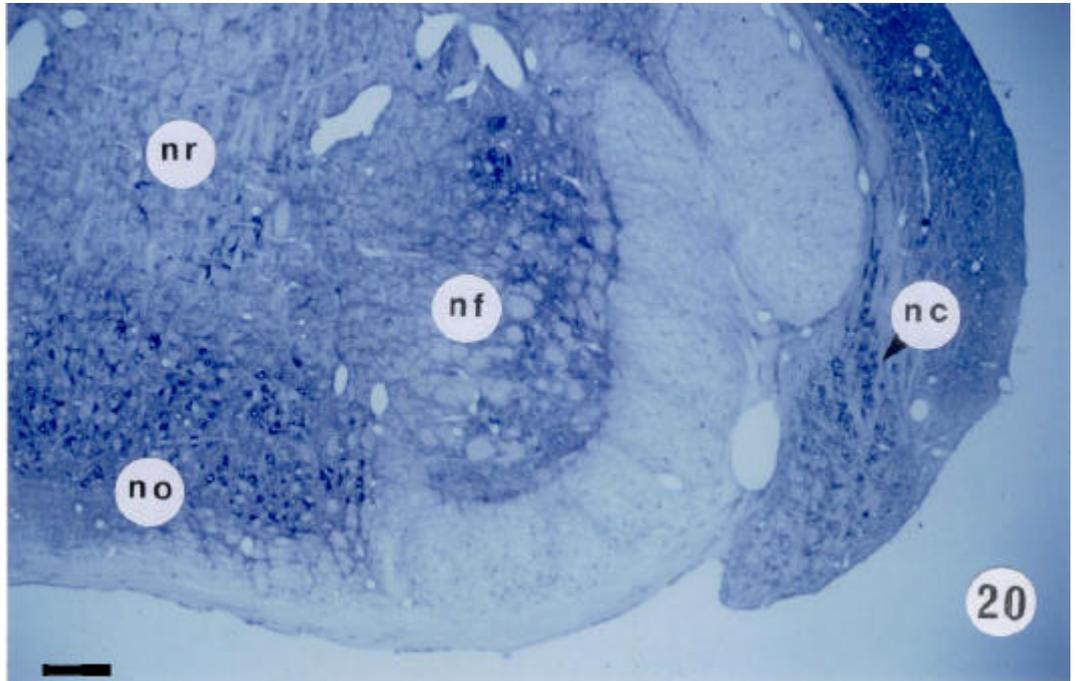


Fig. 21: Glioxilato deshidrogenasa. Médula oblongada. Se observa intensa reacción positiva en neuronas olivares (no) y en neuronas perivasculares (npv).

Escala de barras = 60,2 μ m.

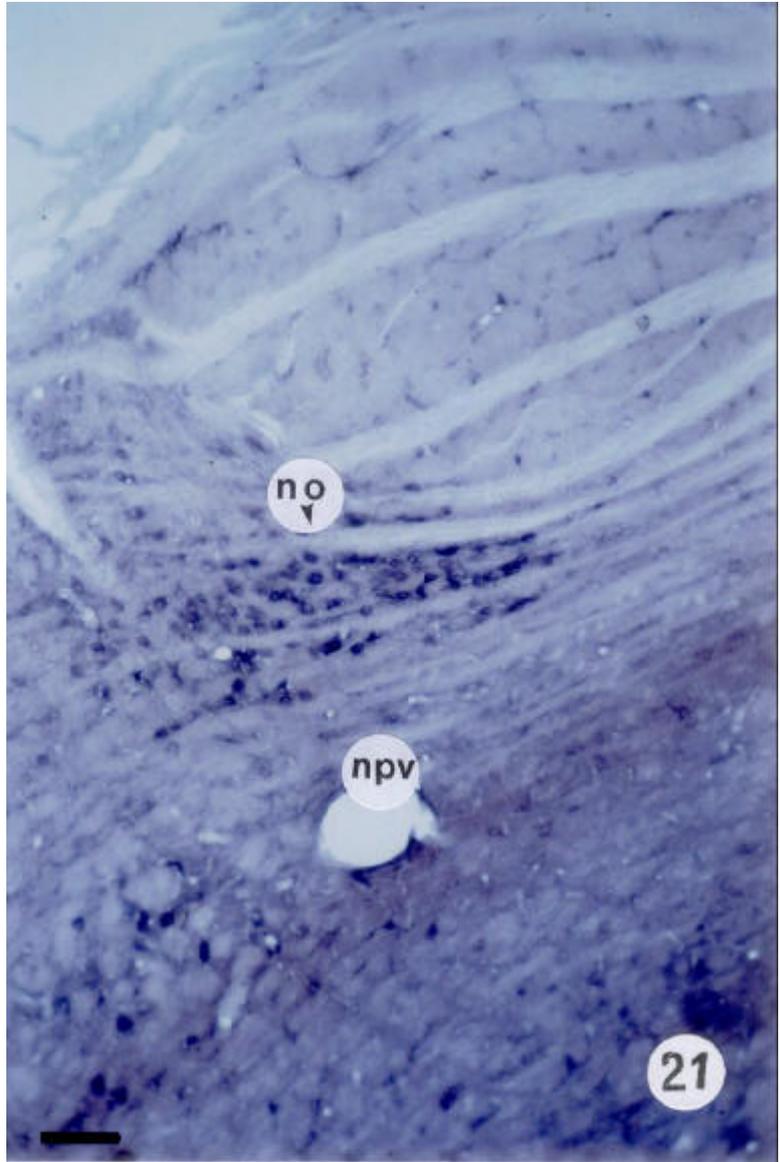
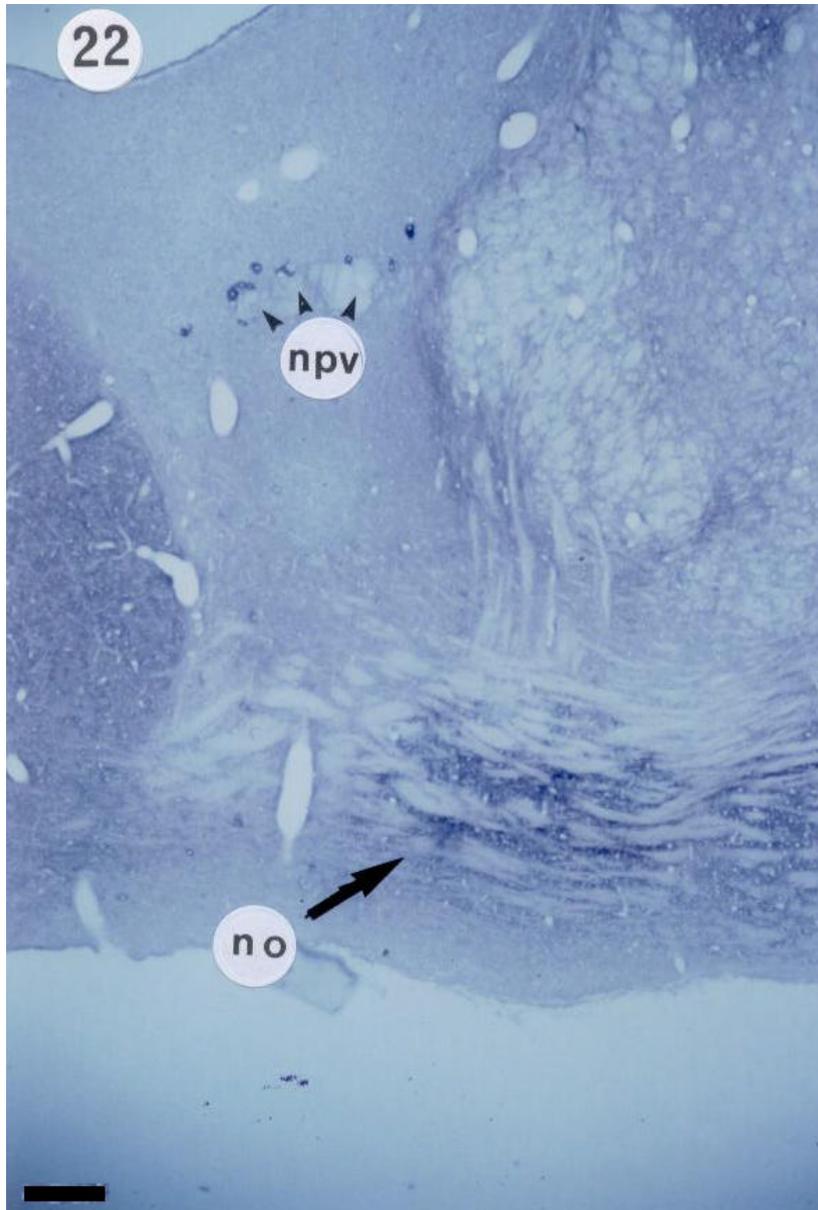


Fig. 22: Glioxilato deshidrogenasa. Médula oblongada. Se observa intensa reacción positiva en neuronas olivares (no) y en neuronas perivasculares (npv).

Escala de barras = 80,5 μ m.



INMUNOHISTOQUÍMICA

Figs. 23: Técnica de inmunodifusión en gel. As: antisuero, 1= Glioxilato-BSA, 2= BSA, 3= Glioxilato-Tiroglobulina, 4= Tiroglobulina, 5-6= Control.

Figs. 24: Técnica del Dot Blot.

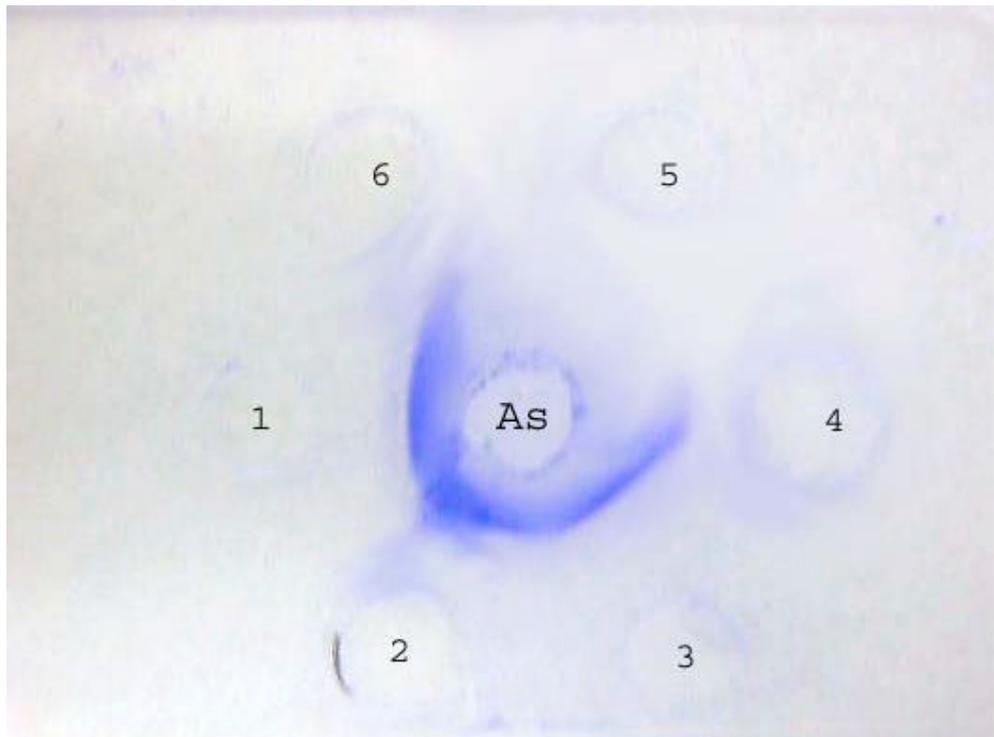


Fig.23

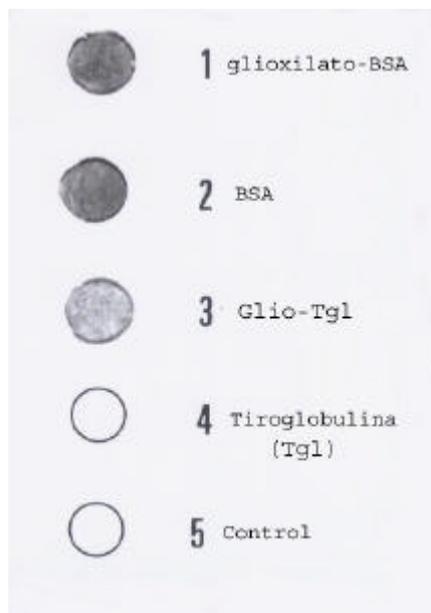


Fig.24

CORTEZA PREFRONTAL

Fig. 25: Corteza Prefrontal. Se observan neuronas inmunopositivas contra el complejo Glioxilato BSA en neuronas situadas preferentemente en las capas 4 y 5 de la corteza prefrontal. 1, 2, 3, 4, 5, y 6 marcan la situación de las diversas capas de la corteza prefrontal. Escala de barras = 80,5 μ m.

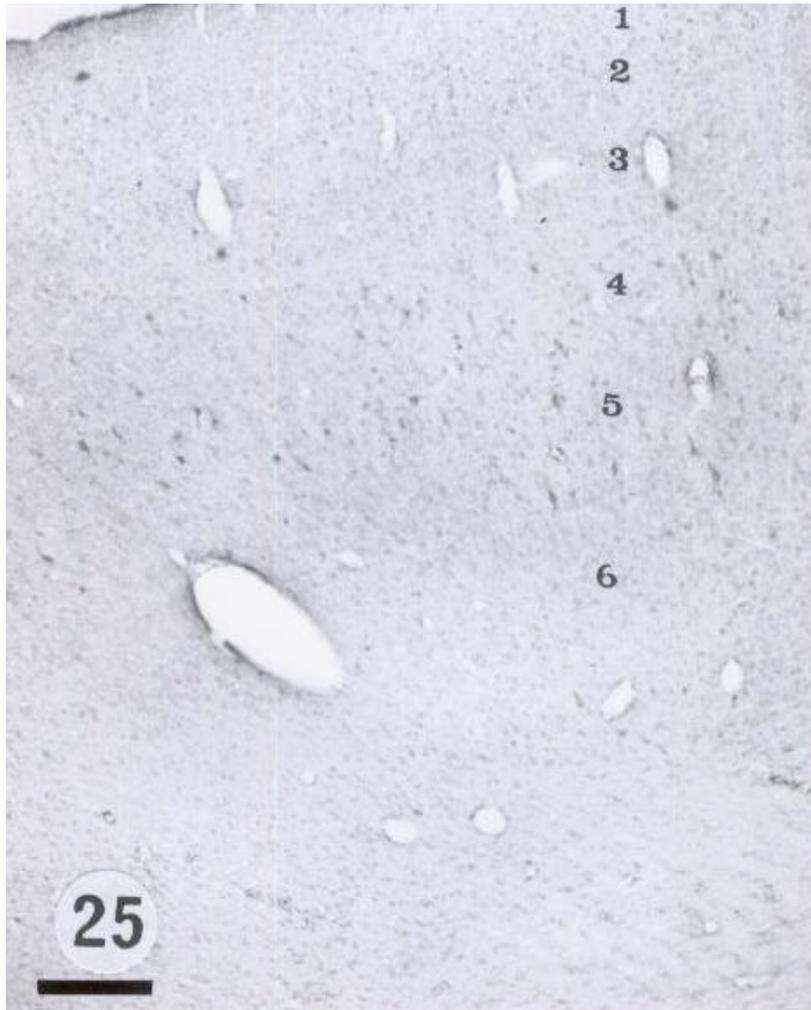


Fig. 26: Corteza Prefrontal. En esta figura se observan neuronas multipolares con reacción inmunológica positiva situadas en la capa 5. Hay otras neuronas menos intensamente positivas situadas en la misma capa. Escala de barras = 50,5 μ m.

Fig. 27: Corteza Prefrontal. En esta figura se representan neuronas de la capa 5 en donde la reacción inmunológica positiva se manifiesta en forma de gruesas granulaciones, probablemente lugares sinápticos en el borde del pericarión y las prolongaciones. Escala de barras = 35,5 μ m.

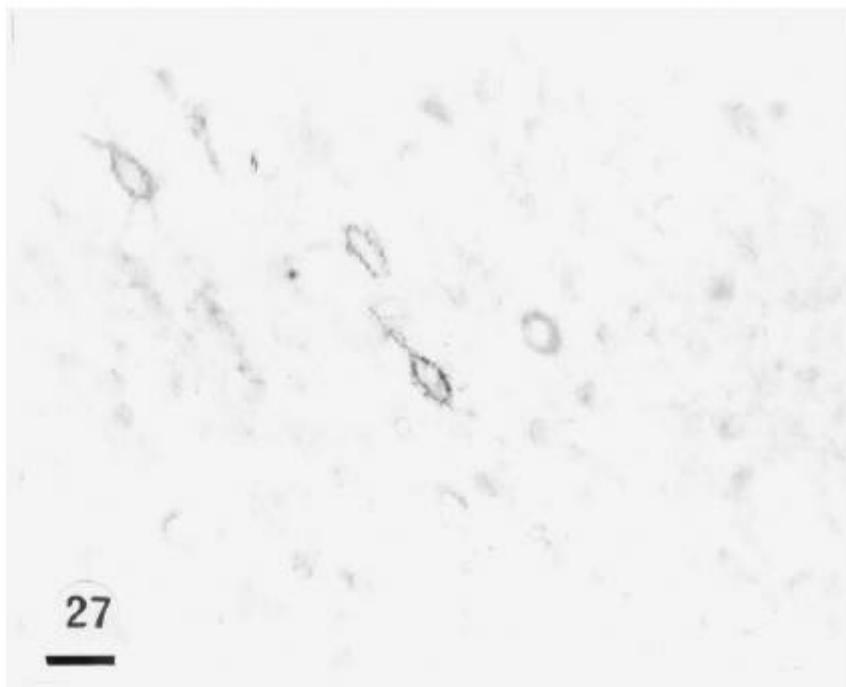
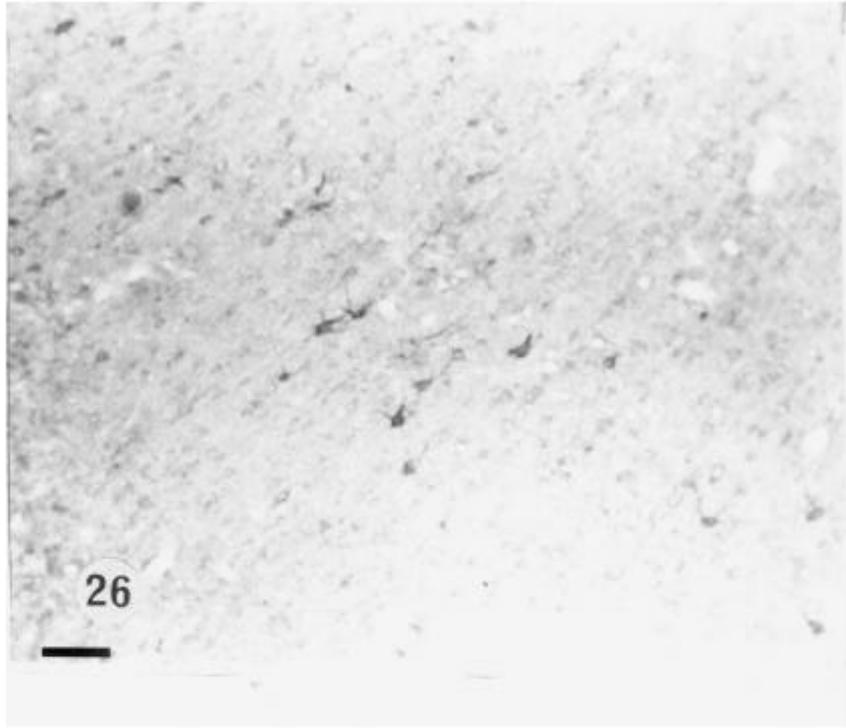


Fig. 28: Corteza Prefrontal. Reacción inmunológica de control correspondiente a secciones histológicas de la región prefrontal incubadas con suero no inmunizado de conejo en vez del suero procedente de conejos inmunizados con complejo glioxilato-BSA. Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig. 29: Corteza Prefrontal. Sección control incubada con suero de conejo anti-BSA (Sigma-Chem.) en vez del suero específico. Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig. 30: Corteza prefrontal. Neurona inmunopositiva existente en una sección semifina. Pueden observarse gruesas granulaciones en el borde del pericarión y las prolongaciones. Escala de barras = 25,5 μ m.

Fig. 31-36: Corteza Prefrontal. Observación con el microscopio óptico de reacción inmunopositiva contra moléculas BSA-glioxilato en el área precentral de la corteza prefrontal. En la fig. 31 se observa reacción inmunopositiva en neuronas dispersas en las capas 4 y 5, pero no en la 6. En las figs. 32, 33, 34, 35 y 36 se aprecian neuronas de distinto tamaño y distinta intensidad de la inmunoreacción. La inmunoreacción positiva se observa siempre en forma de granulaciones. Escala de barras = 70,5 μ m en fig.31, 50,5 μ m en fig. 32, 35,5 μ m en figs. 33-36.

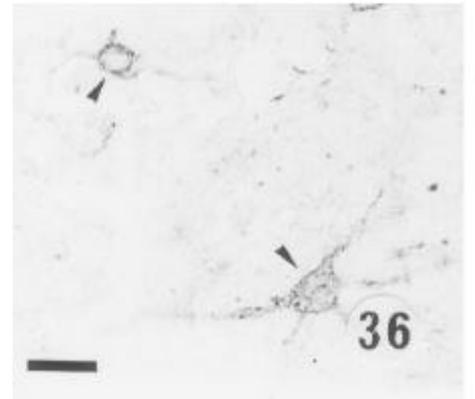
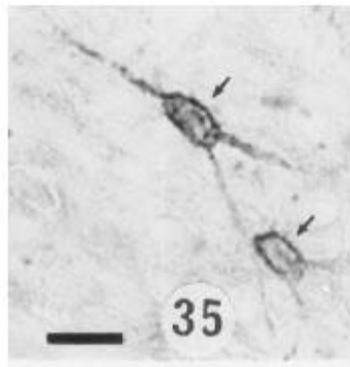
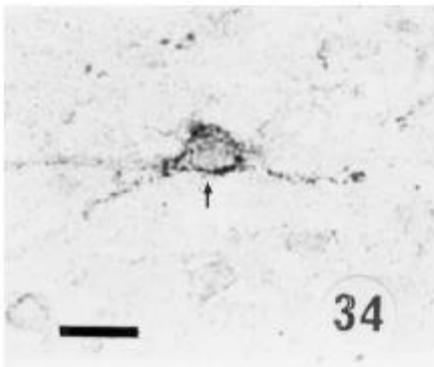
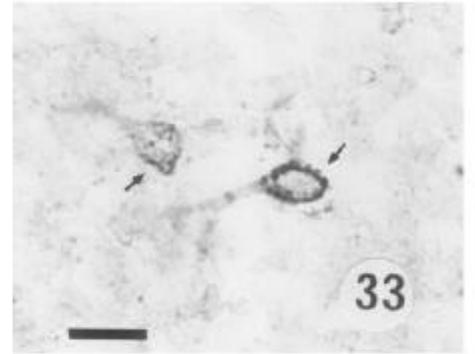
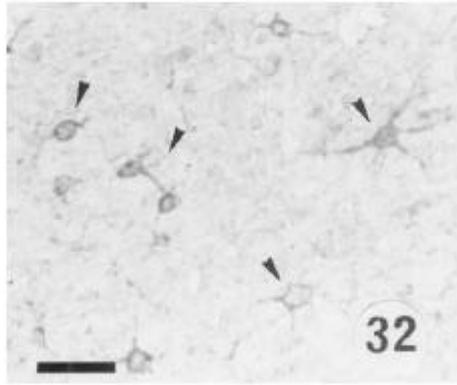
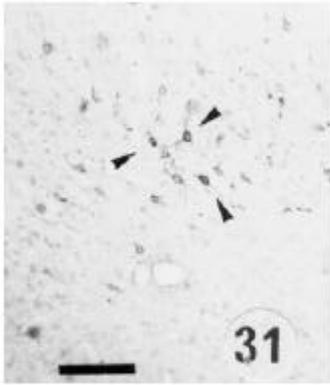
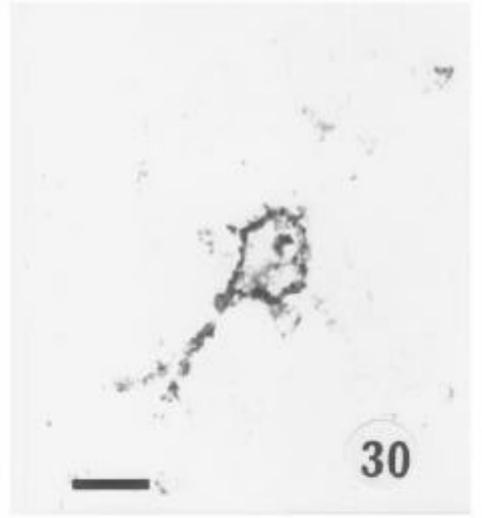


Fig. 37: Corteza Prefrontal. Se observa reacción inmunopositiva en astrocitos de la sustancia blanca de la corteza prefrontal. Escala de barras = 25,5 μ m.

Fig. 38-39: Corteza Prefrontal. Se observa reacción inmunopositiva en neuronas de una sección semifina de área precentral. Escala de barras = 35,6 μ m en figs. 38 y 39.

Fig. 40: Reacción inmunológica positiva asociada a vesículas sinápticas y membranas sinápticas en un axón terminal de la corteza prefrontal (+A). D = dendrita. Escala de barras = 0,55 μ m.

Fig. 41: Corteza Prefrontal. Reacción inmunopositiva en prolongaciones astrogliales asociadas a la pared de un capilar de la corteza prefrontal de la rata. Escala de barras = 35,6 μ m.

Fig 42: Corteza Prefrontal. Axón con reacción inmunopositiva (+A) que hace sinápsis con dendrita inmunonegativa (D). Escala de barras = 0,17 μ m.

Fig. 43: Corteza prefrontal. Inmunoreacción positiva en varios axones mielínicos del área de la corteza prefrontal de la rata. Escala de barras = 0,13 μ m.

Fig. 44: Reacción inmunológica positiva pero de variable intensidad en axones terminales (+A) que hacen sinápsis con varias dendritas (D). El inmunoprecipitado se presenta asociado a vesículas y a membranas sinápticas. Escala de barras = 0,17 μ m.

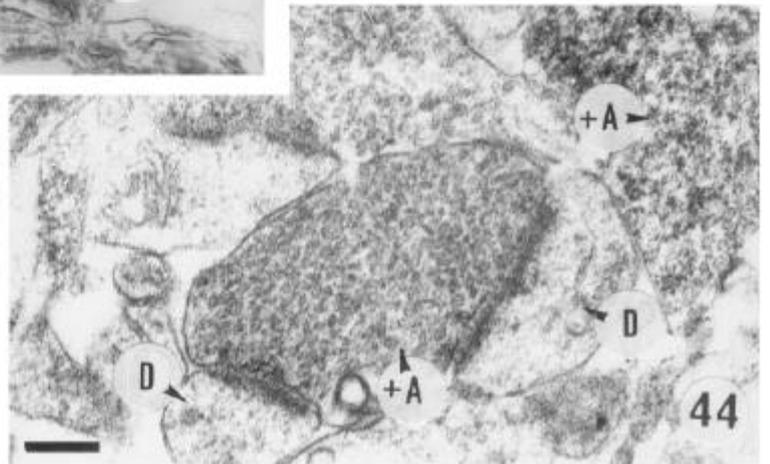
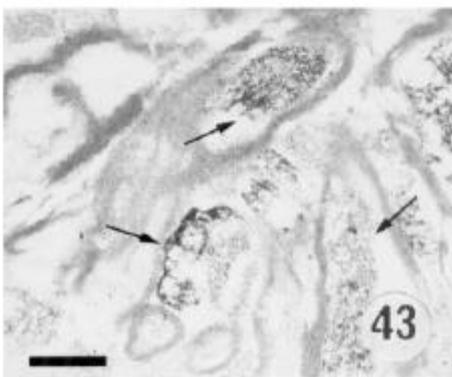
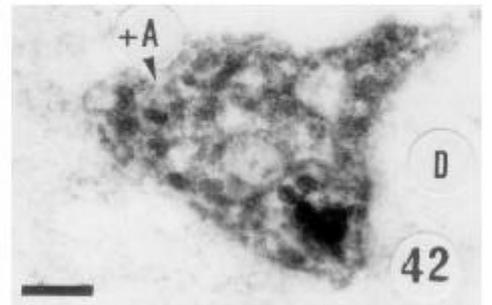
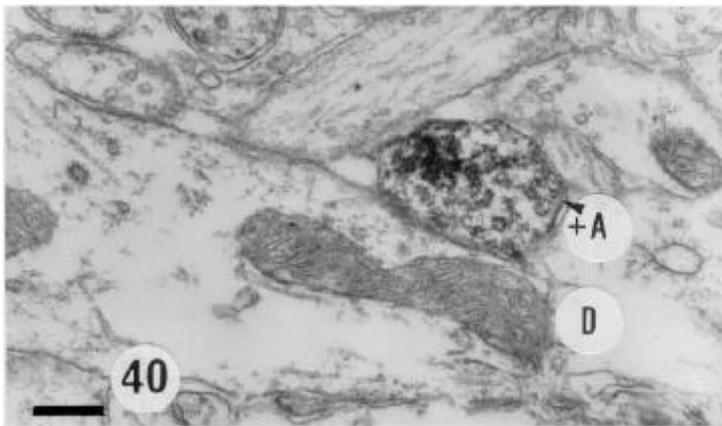
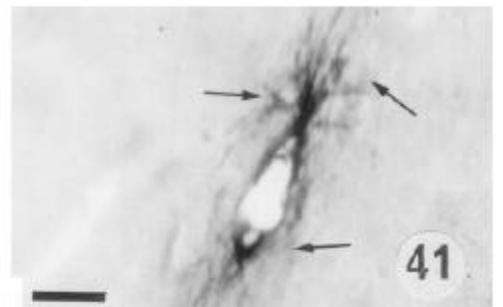
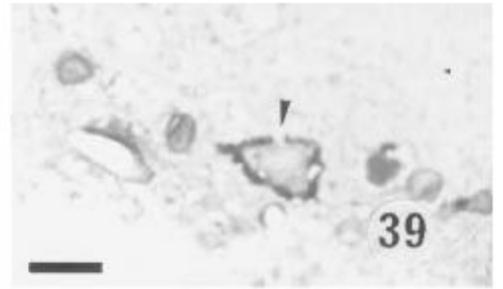
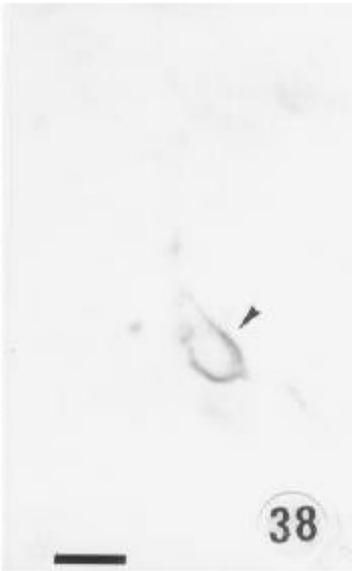
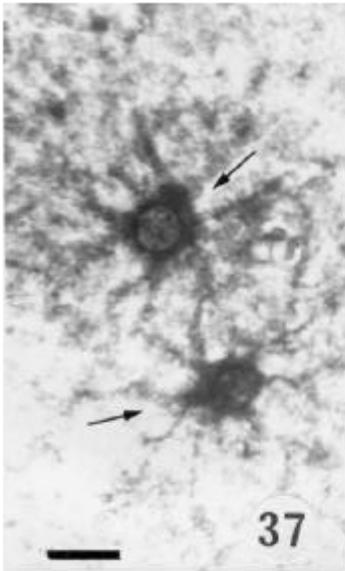


Fig. 45: Corteza Prefrontal. Neuronas inmunopositivas en la capa 4 y 5 del área precentral de la corteza prefrontal de la rata. Escala de barras = 70,5 μ m.

Fig. 46: Corteza Prefrontal. Neuronas de la misma localización que en fig. anterior a mayor aumento. Se observa que algunas de dichas neuronas emiten prolongaciones a los vasos capilares. Escala de barras = 35,5 μ m.

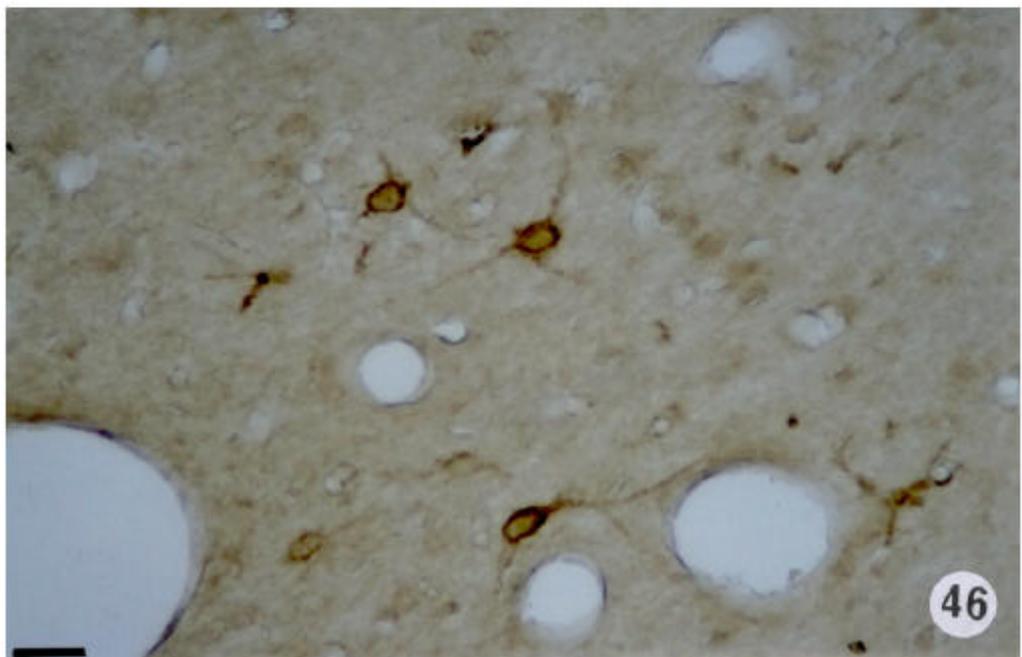
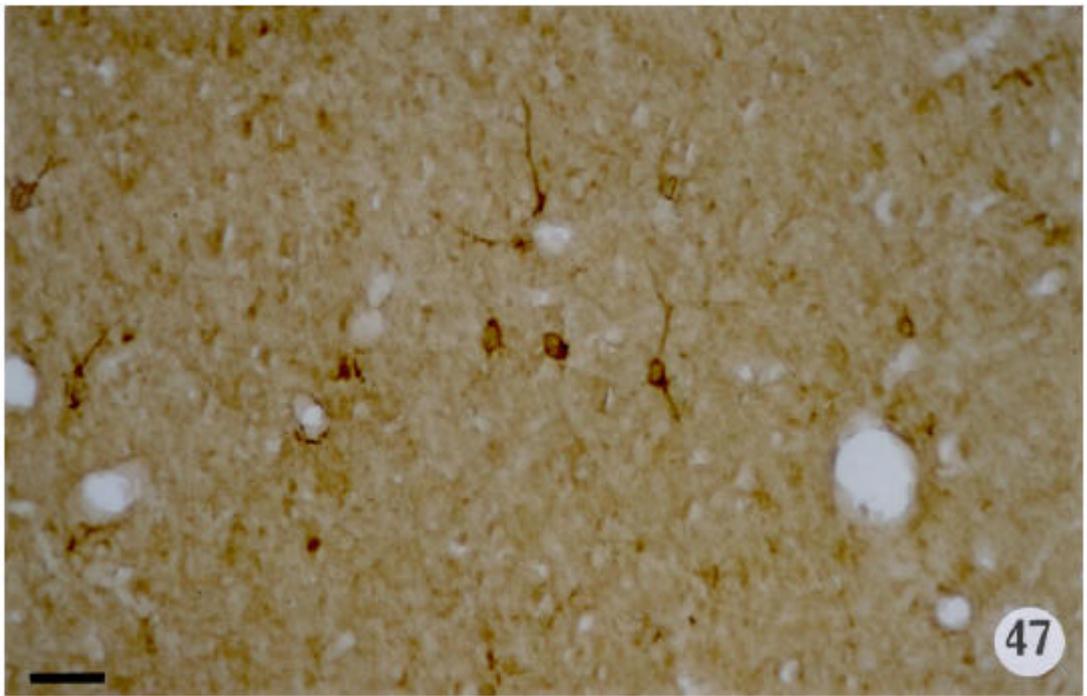


Fig. 47: Corteza Prefrontal. Neuronas inmunopositivas de la misma localización que figs. 45 y 46. Escala de barras = 50,5 μ m.



CORTEZA FRONTOPARIETAL

Fig. 48: Sección incubada en medio inmunocitoquímico control (medio A) para determinar moléculas originadas de la transaminación del ácido glioxílico y moléculas aminadas. No se observa reacción positiva en áreas cinguladas (AC) y motora (AM). Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig. 49: Sección incubada en medio inmunocitoquímico control (medio A) para determinar moléculas originadas de la transaminación del ácido glioxílico y moléculas aminadas. No se observa reacción positiva en áreas motora (AM) y somatosensorial (ASS). Escala de barras 80,5 μ m.

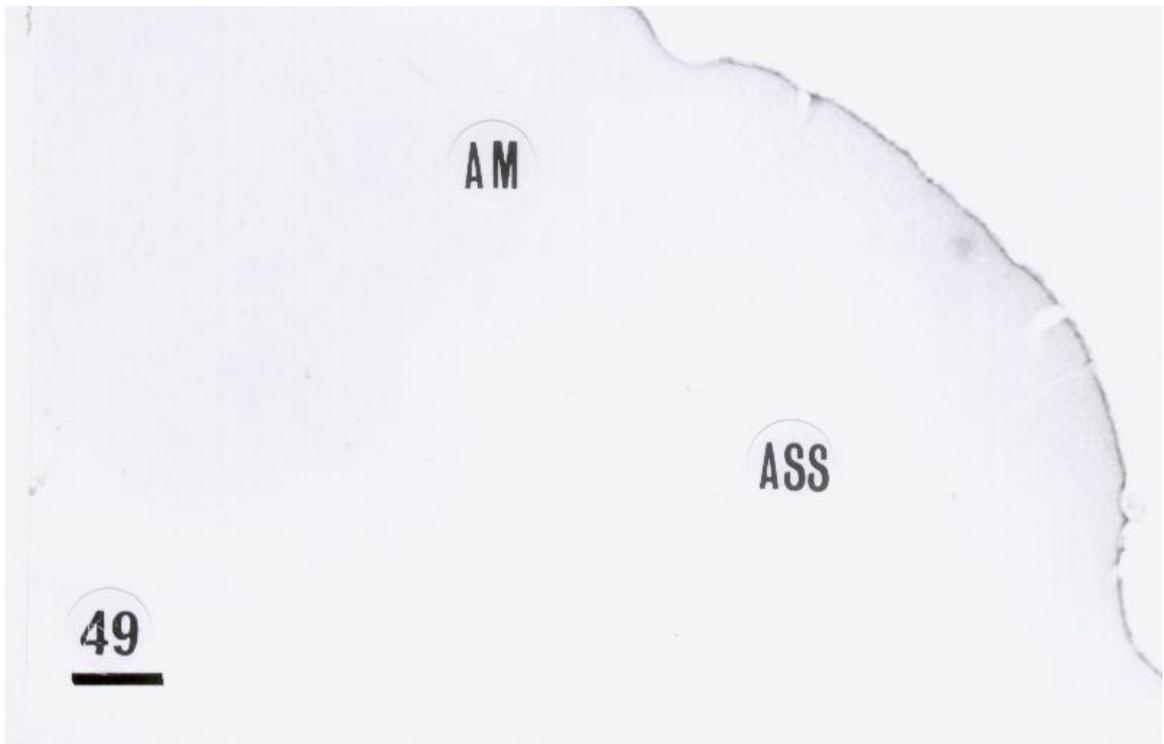
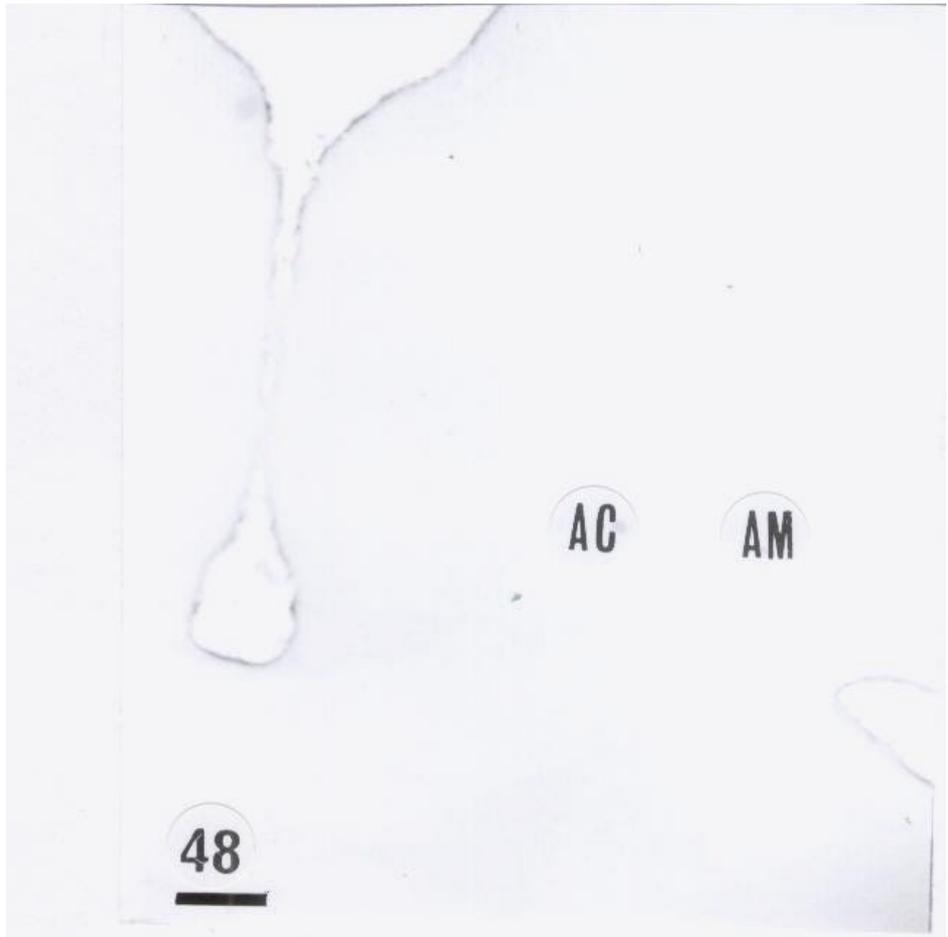


Fig. 50: Secciones de corteza frontoparietal incubadas en medio histoquímico para determinar moléculas originadas como consecuencia de la transaminación entre el ácido glioxílico y moléculas aminadas. Se utilizó antisuero diluido 1/500 procedente de conejos inmunizados contra dichas moléculas. Se observa reacción positiva en neuronas situadas preferentemente en capas 5^a y 6^a. Dicha microfotografía ha sido obtenida en área motora. Escala de barras 50,5 μ m.

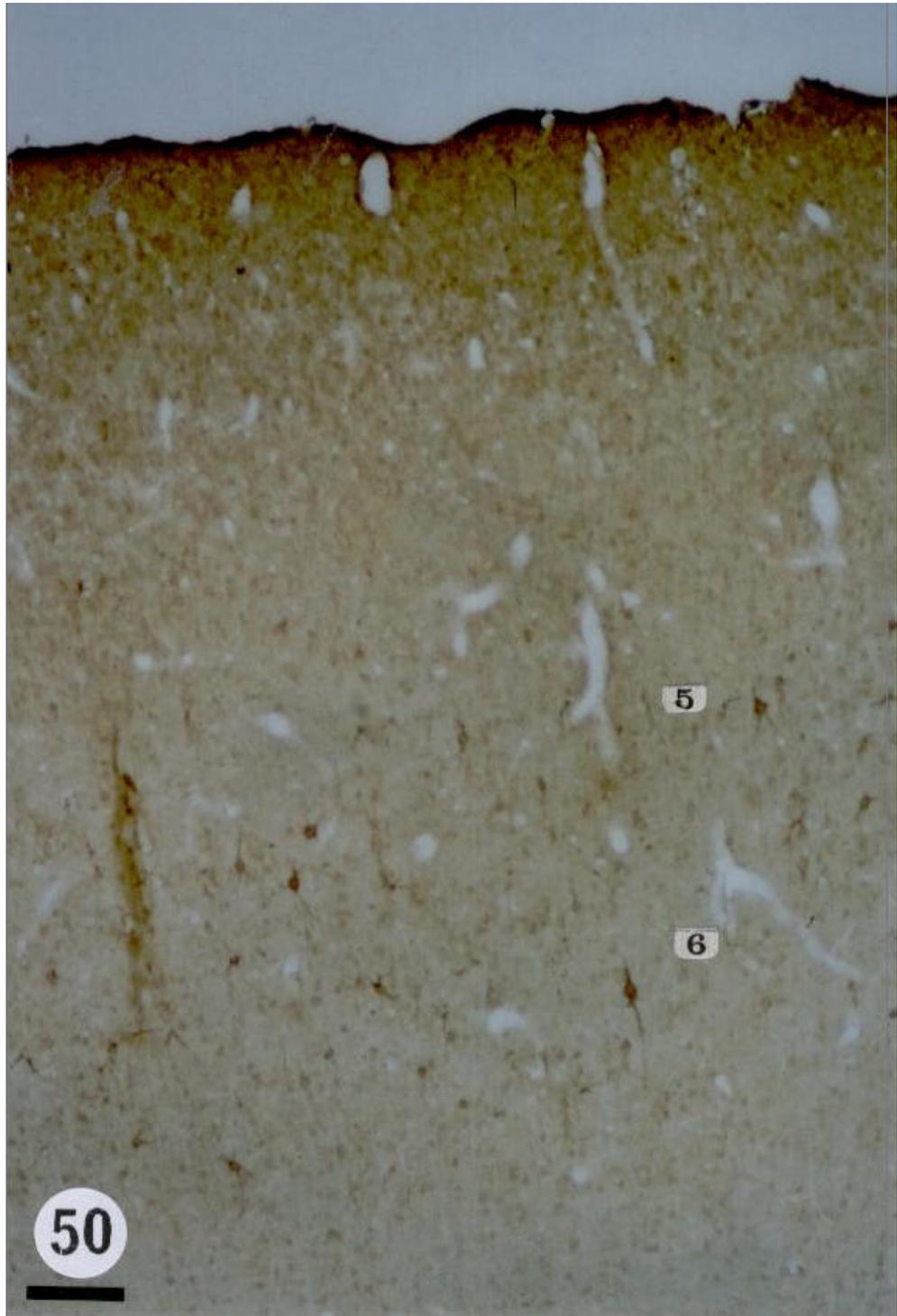


Fig. 51: Secciones de corteza frontoparietal incubadas en medio histoquímico para determinar moléculas originadas como consecuencia de la transaminación entre el ácido glioxílico y moléculas aminadas. Se utilizó antisuero diluido 1/500 procedente de conejos inmunizados contra dichas moléculas. Se observa reacción positiva en neuronas situadas preferentemente en capas 5^a y 6^a. Dicha microfotografía ha sido obtenida en área somatosensorial. Escala de barras 50,5 μ m.

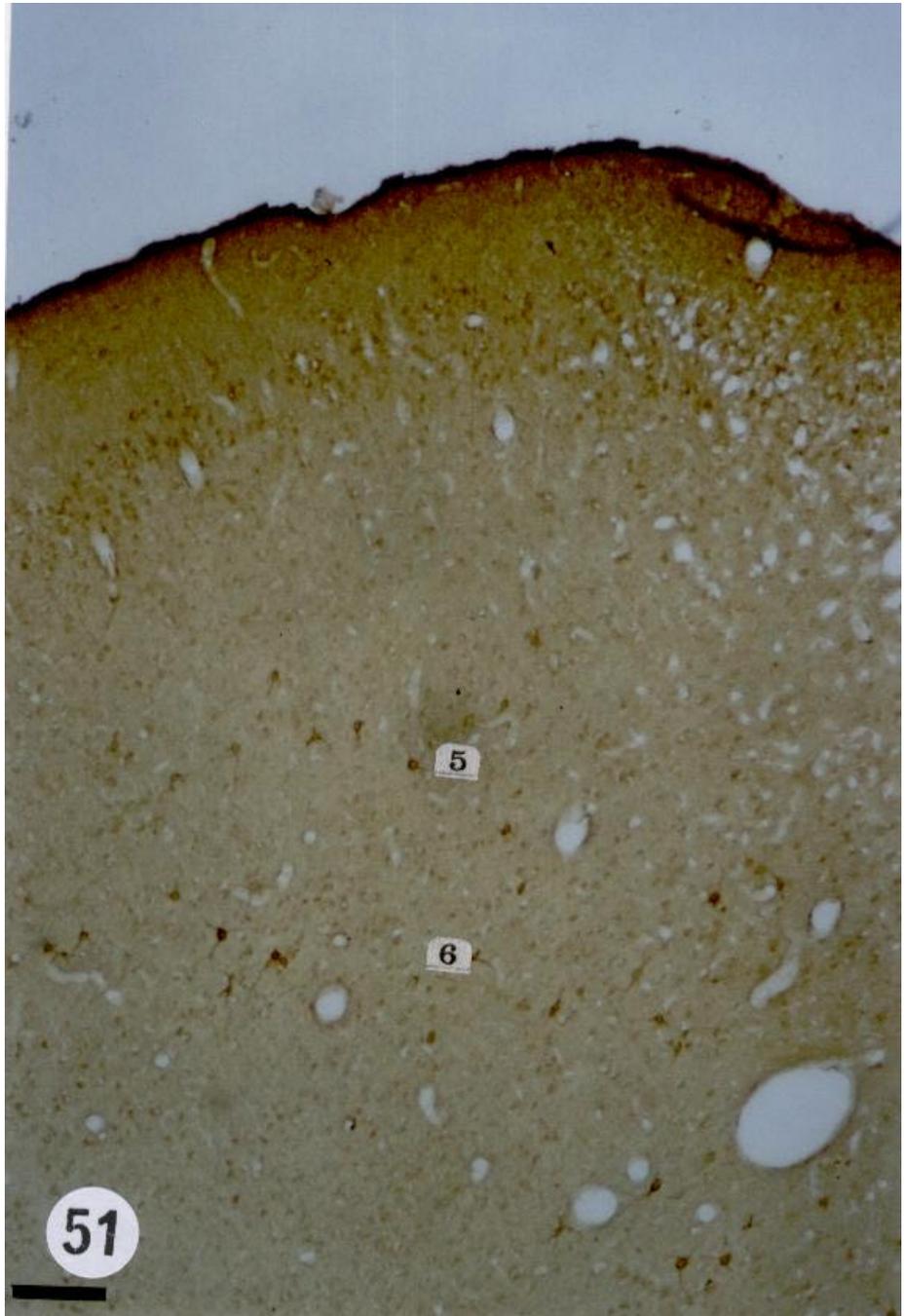


Fig. 52: Reacción inmunocitoquímica positiva en neuronas del área motora pertenecientes a la capa 6^a. Escala de barras = 35,5 μ m.

Fig. 53: Neuronas con reacción inmunocitoquímica positiva intensa en periferia de neuronas no piramidales de la capa 5^a de la zona somatosensorial. Escala de barras = 35,5 μ m.

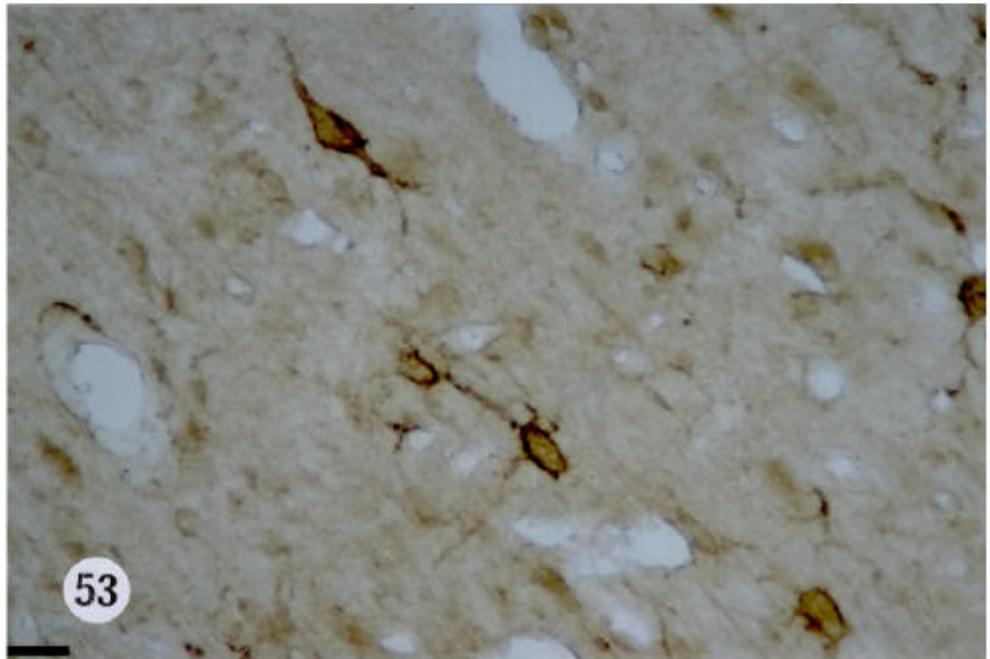
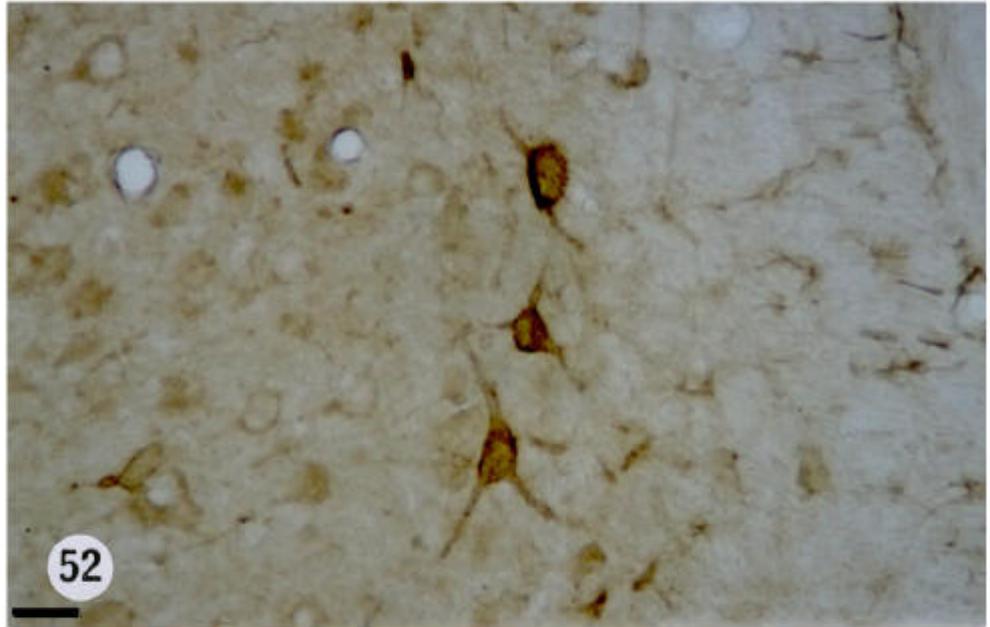


Fig. 54: Se representa una neurona bipolar en el área motora con reacción inmunocitoquímica intensamente positiva en forma de granulaciones en la periferia del cuerpo celular y de las prolongaciones. Escala de barras = 25,5 μ m.

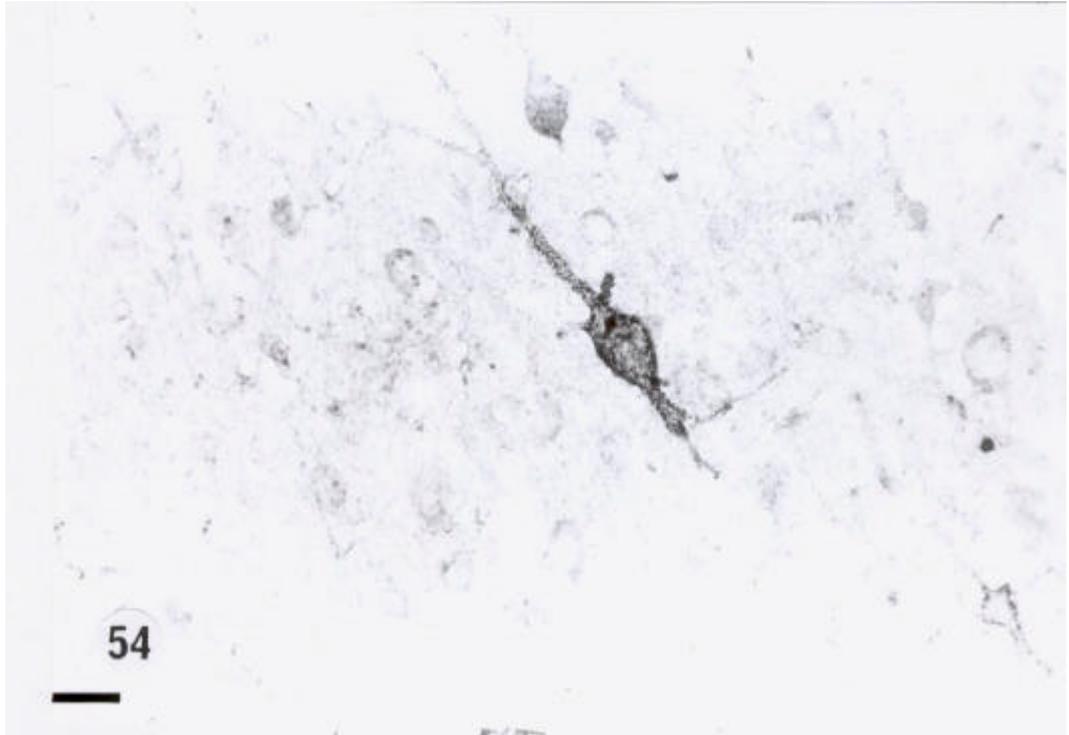


Fig. 55: Se representa una neurona bipolar en el área somatosensorial con reacción inmunocitoquímica intensamente positiva en forma de granulaciones en la periferia del cuerpo celular y de las prolongaciones. Escala de barras = 35,5 μ m.

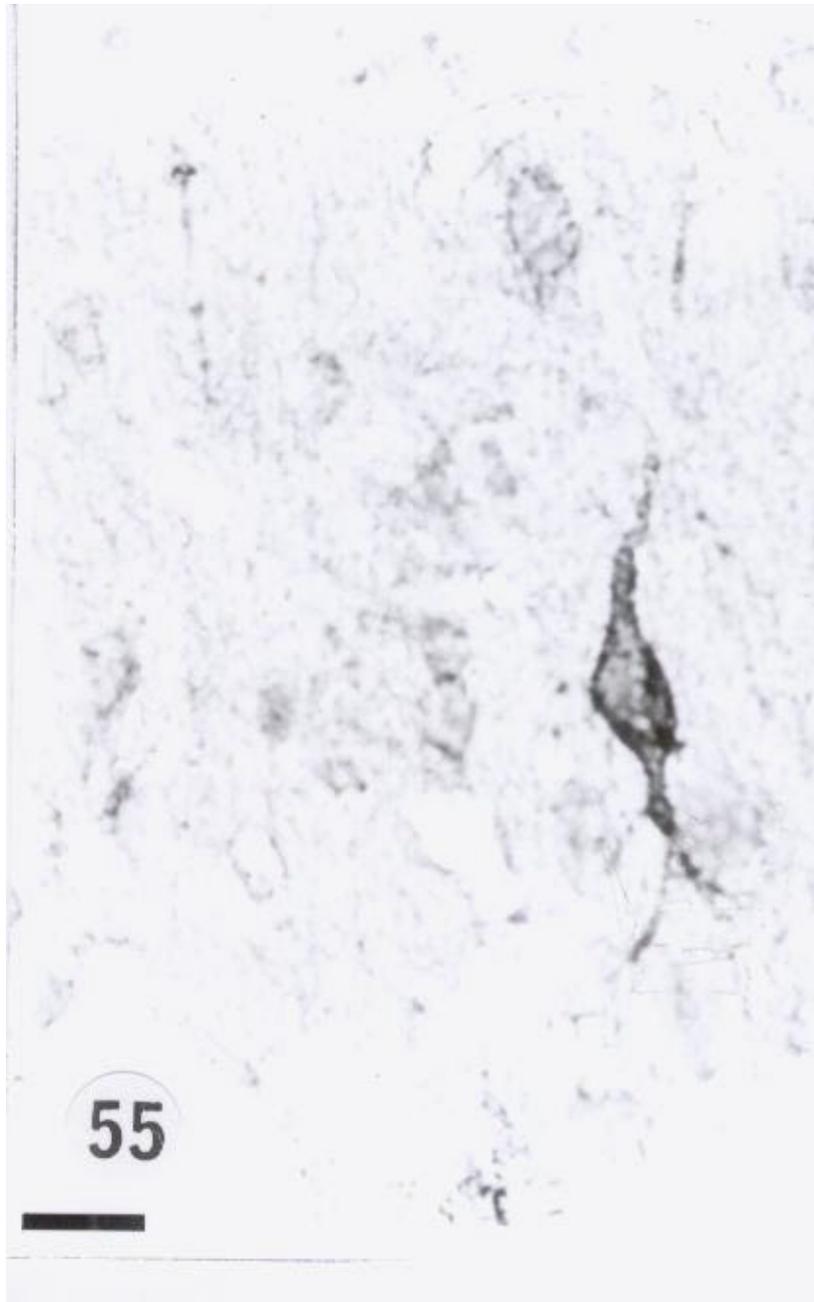


Fig. 56: Neuronas de las capas 4^a y 5^a del área cingulada con reacción inmunocitoquímica intensamente positiva. Escala de barras = 50,5 μ m.



Fig. 57: Neuronas de las capas 4^a y 5^a del área cingulada con reacción inmunocitoquímica intensamente positiva. Escala de barras = 50,5 μ m.

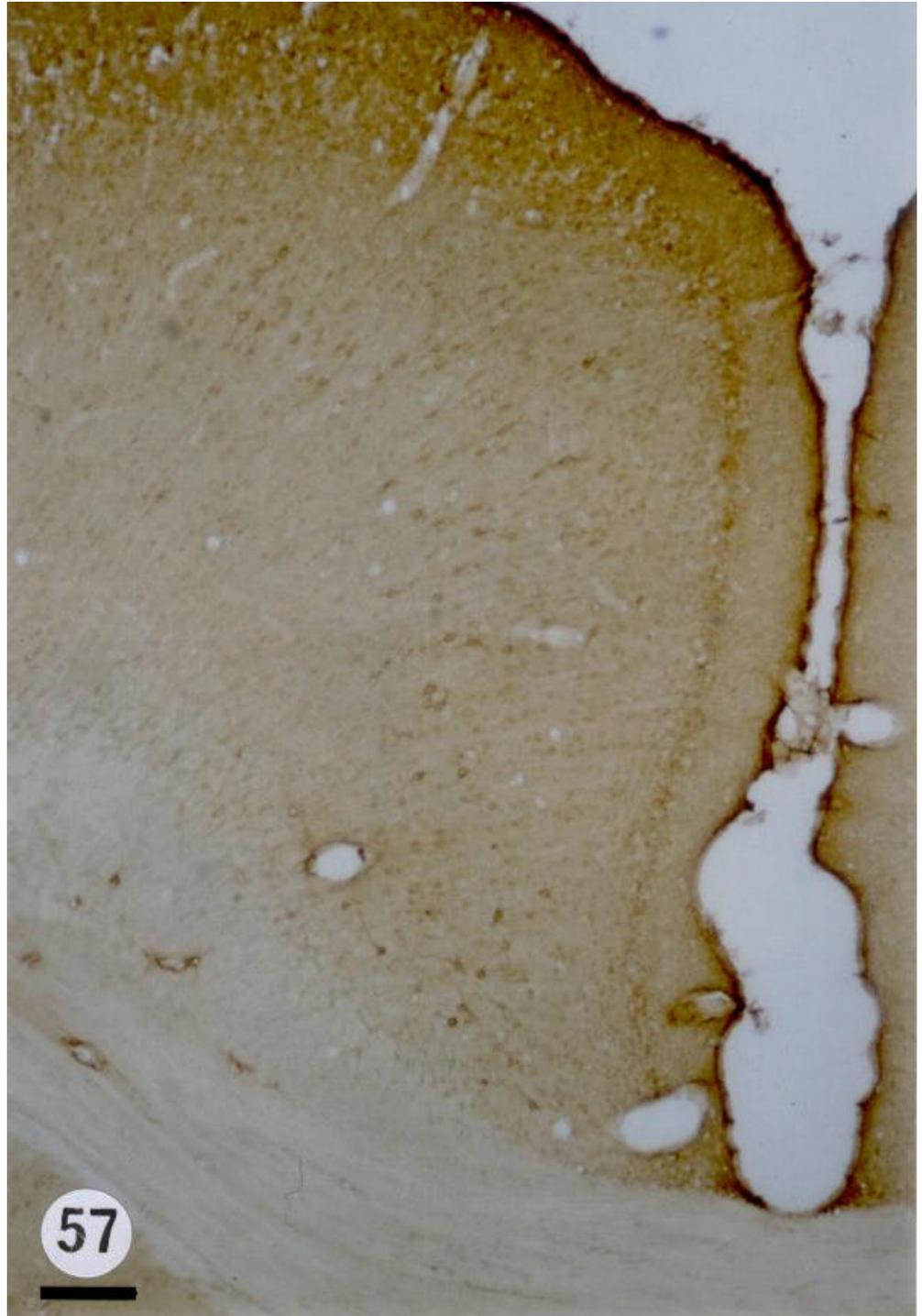


Fig. 58: Neurona con reacción inmunocitoquímica intensamente positiva con prolongaciones que se acoplan a la pared de un capilar (cap). Escala de barras = 35,5 μ m.

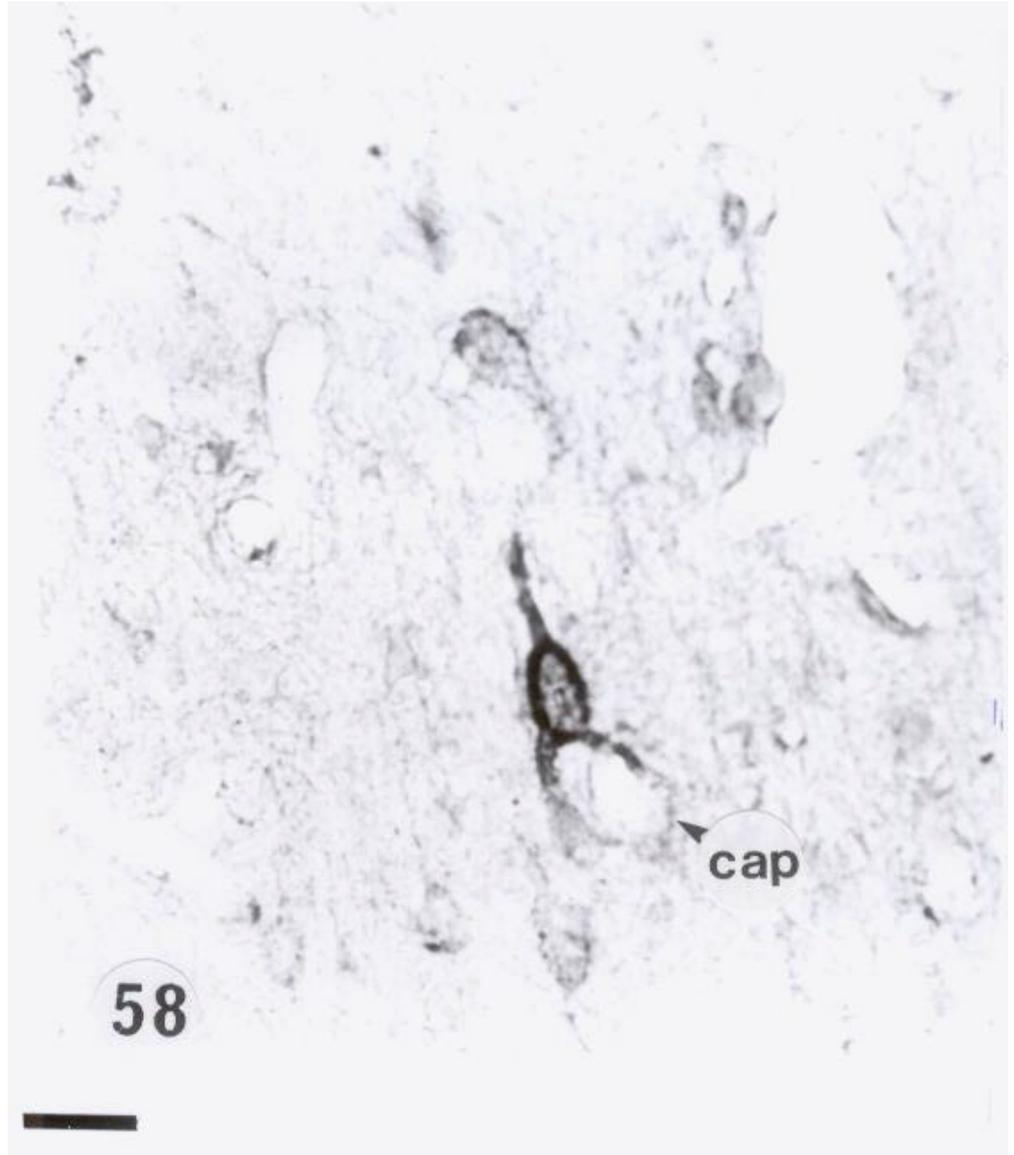
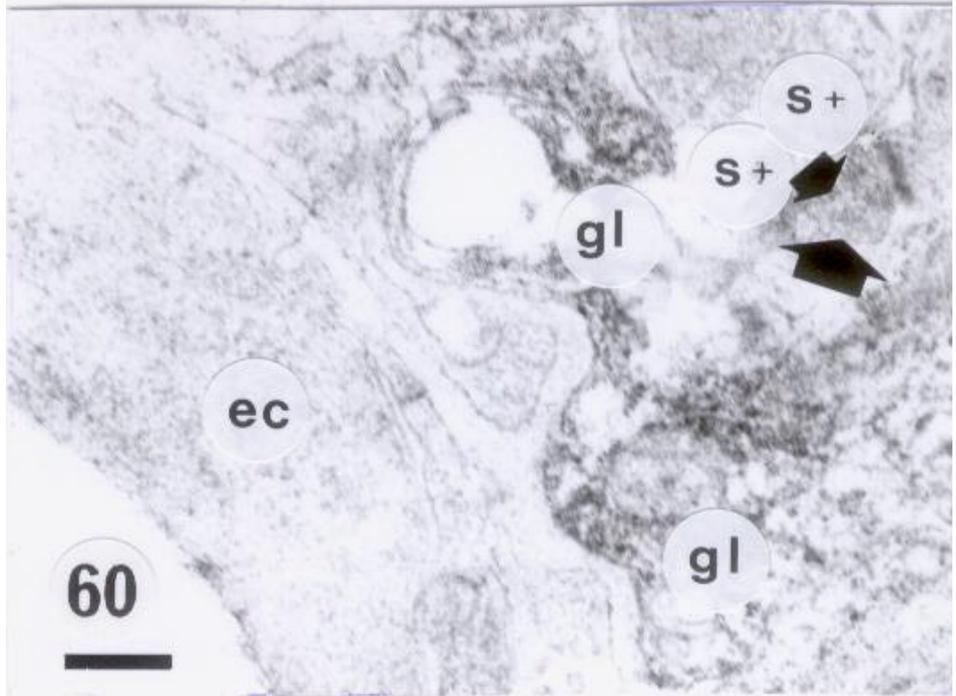
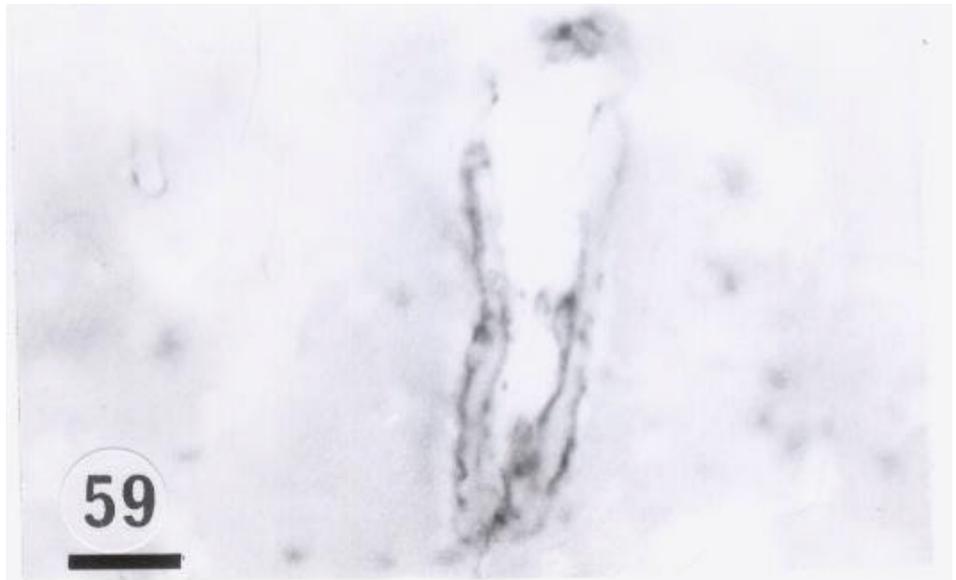


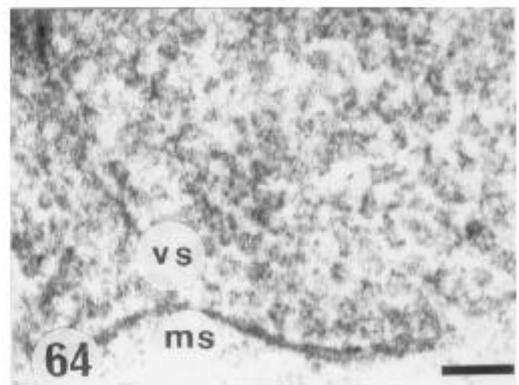
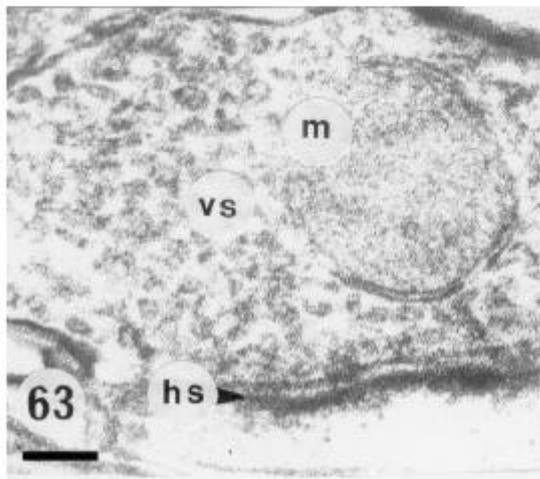
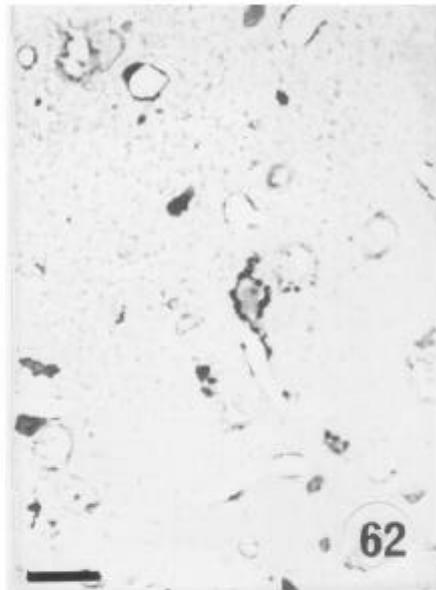
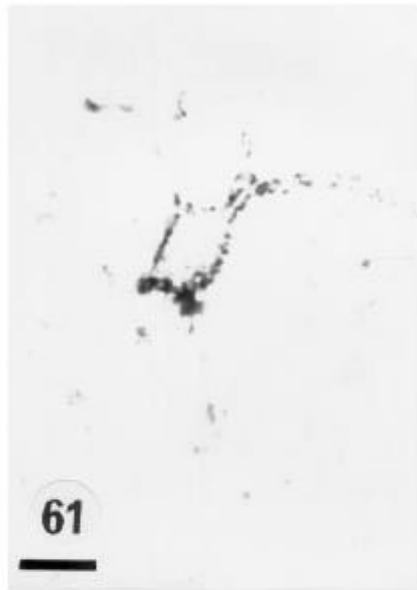
Fig. 59: Corte semifino de la región frontoparietal. Se observa reacción inmunocitoquímica positiva en la pared de un capilar sanguíneo. Escala de barras = 35,6 μ m.

Fig. 60: Corteza frontoparietal. Observación con microscopio electrónico de reacción positiva en zonas sinápticas (S+) y en prolongaciones gliales (gl) situadas en relación con un capilar sanguíneo (ec = endotelio capilar). Escala de barras = 0,67 μ m.



Figs. 61 y 62: Se representan neuronas intensamente positivas en cortes semifinos de la corteza frontoparietal. Escala de barras = 25,5 en fig. 61 y 35,5 en fig. 62.

Figs. 63 y 64: Se observan reacciones inmunocitoquímicas positivas en la pared de la vesícula psináptica (vs), en mitocondrias (m), en la hendidura sináptica (hs) y membrana sináptica (ms). Escala de barras = 0.5 μ m en figs. 63-64.



CORTEZA TEMPORAL

Fig. 65: Corteza temporal. Sección histológica incubada en medio histoquímico control, es decir en medio en el que el anticuerpo primario es suero de conejo anti-BSA. La reacción inmunohistoquímica se observa negativa. Escala de barras = 80,5 μ m.



Fig. 66: Área estriada 17. La reacción inmunohistoquímica se observa positiva en relación con antígenos glioxilato-BSA en neuronas situadas especialmente en capas 4,5 y 6. Escala de barras = 50,5 μ m.

Fig. 67: Área estriada 17. Neuronas de la sección anterior con reacción inmunohistoquímica positiva observadas a mayor aumento. Escala de barras = 35,5 μ m.

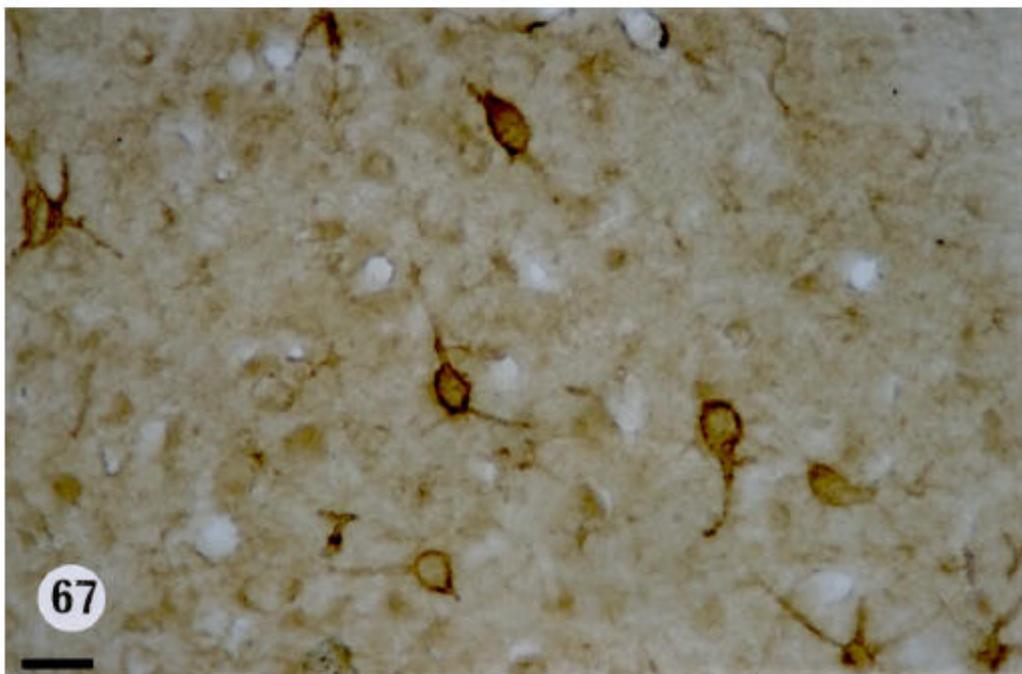


Fig. 68 y 69: Área estriada 18 A. Neuronas inmunopositivas de capa 5 (fig.68) y de las capas 5 y 6 (fig. 69). Escala de barras = 35,5 μ m en fig. 68, 40,5 μ m. en fig. 69.

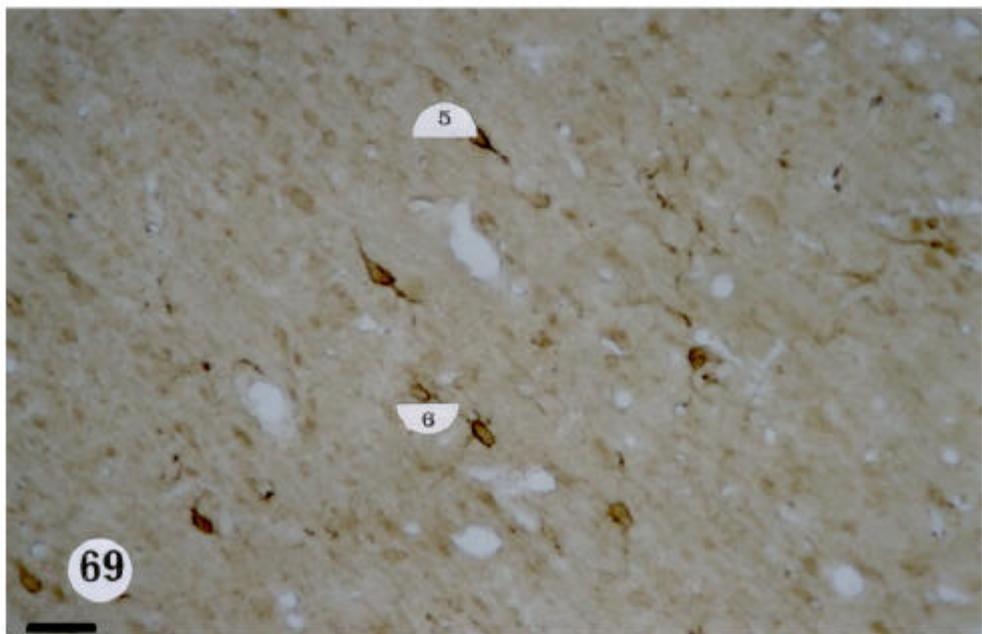
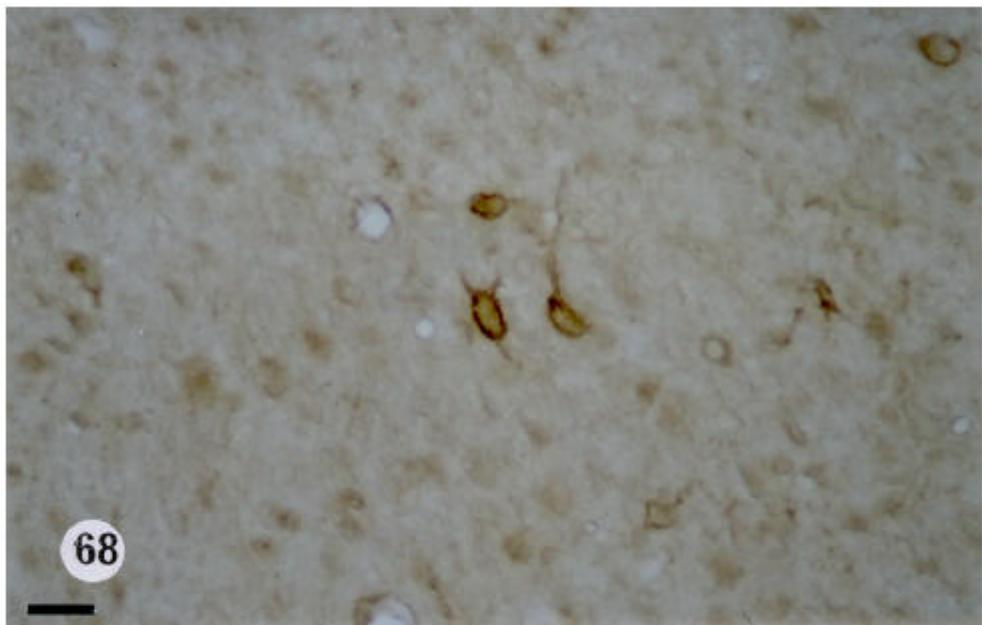


Fig. 70: Área estriada 18. Neuronas inmunopositivas en capa 5.

Escala de barras = 50,5 μ m.

Fig. 71: Área estriada 18. Neuronas inmunopositivas en capa 5.

Escala de barras = 35,5 μ m.

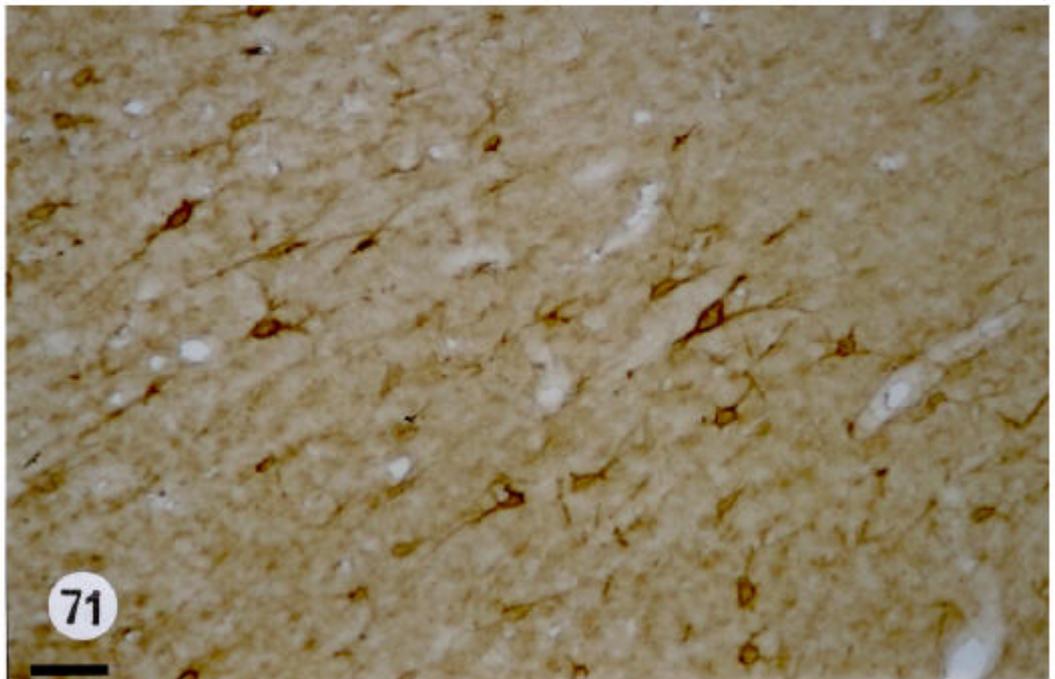
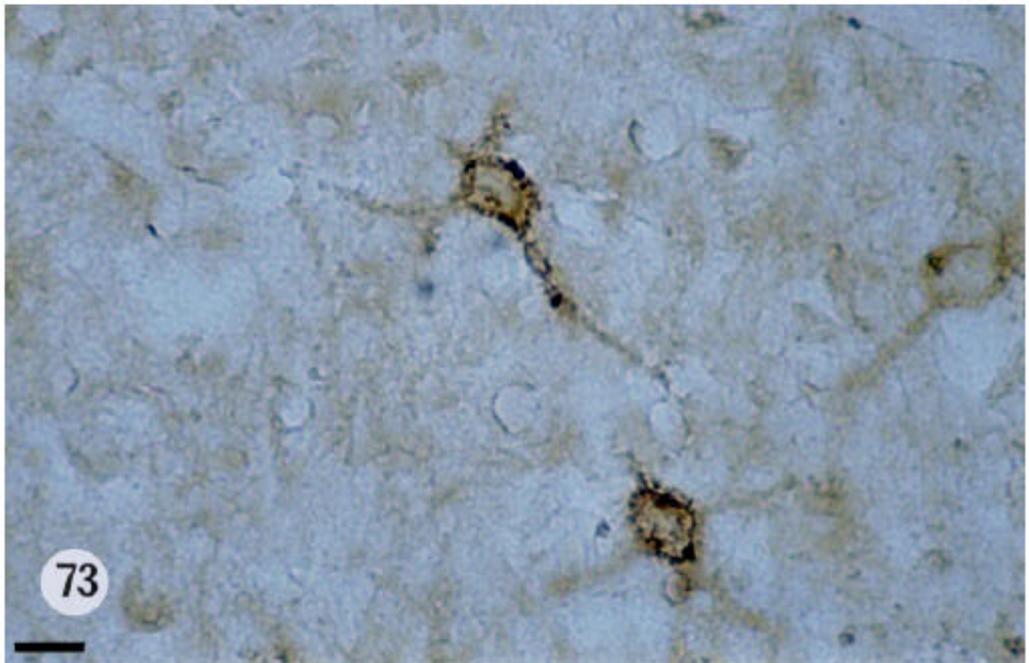
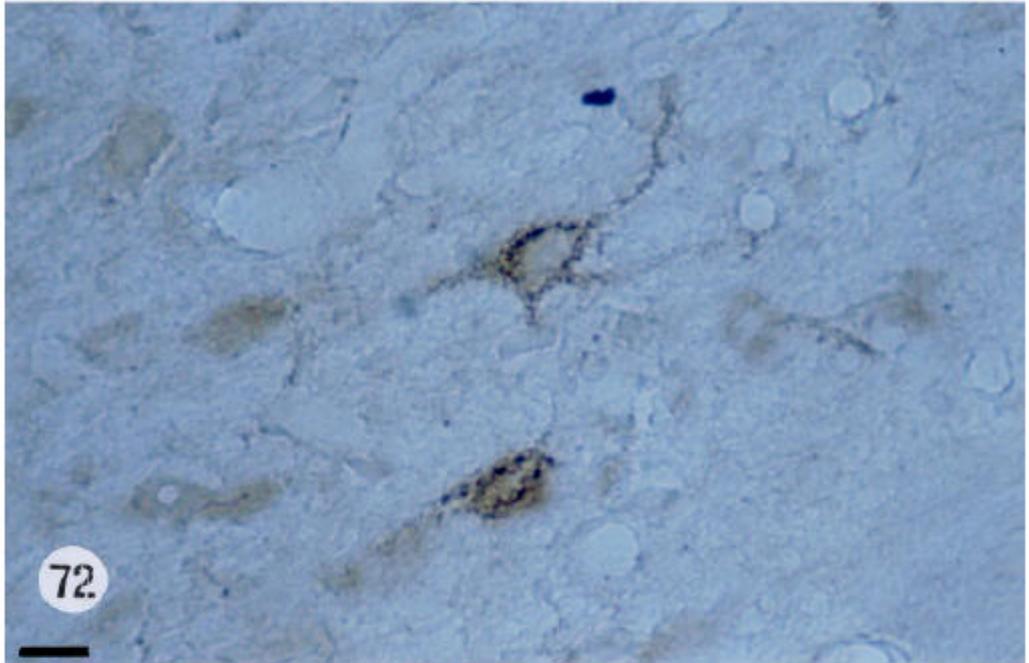


Fig. 72: Área estriada 17. Neuronas inmunopositivas. La reacción se localiza en forma de granulaciones en el borde del pericarion neuronal y de las prolongaciones. Escala de barras = 25,5 μ m.

Fig. 73: Área 18. Neuronas inmunopositivas en forma de granulaciones situadas en la periferia del pericarion neuronal y de las prolongaciones. Escala de barras 25,5 μ m.



HIPOCAMPO POSTERIOR

Fig. 74: Neuronas inmunopositivas situadas en el estrato oriens.

Escala de barras = 50,5 μ m.

Fig. 75: Las mismas neuronas vistas con mayor aumento (escala de barras = 25,5 μ m). Se observa la reacción inmunohistoquímica en forma de granulaciones en el borde del pericarion neuronal y de las prolongaciones.

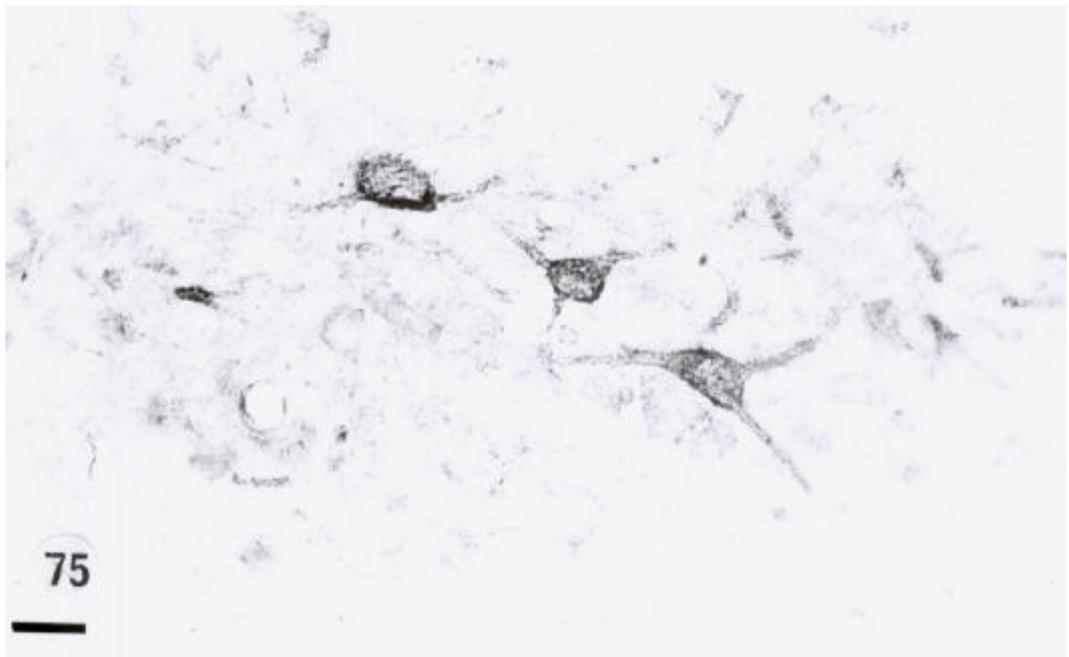
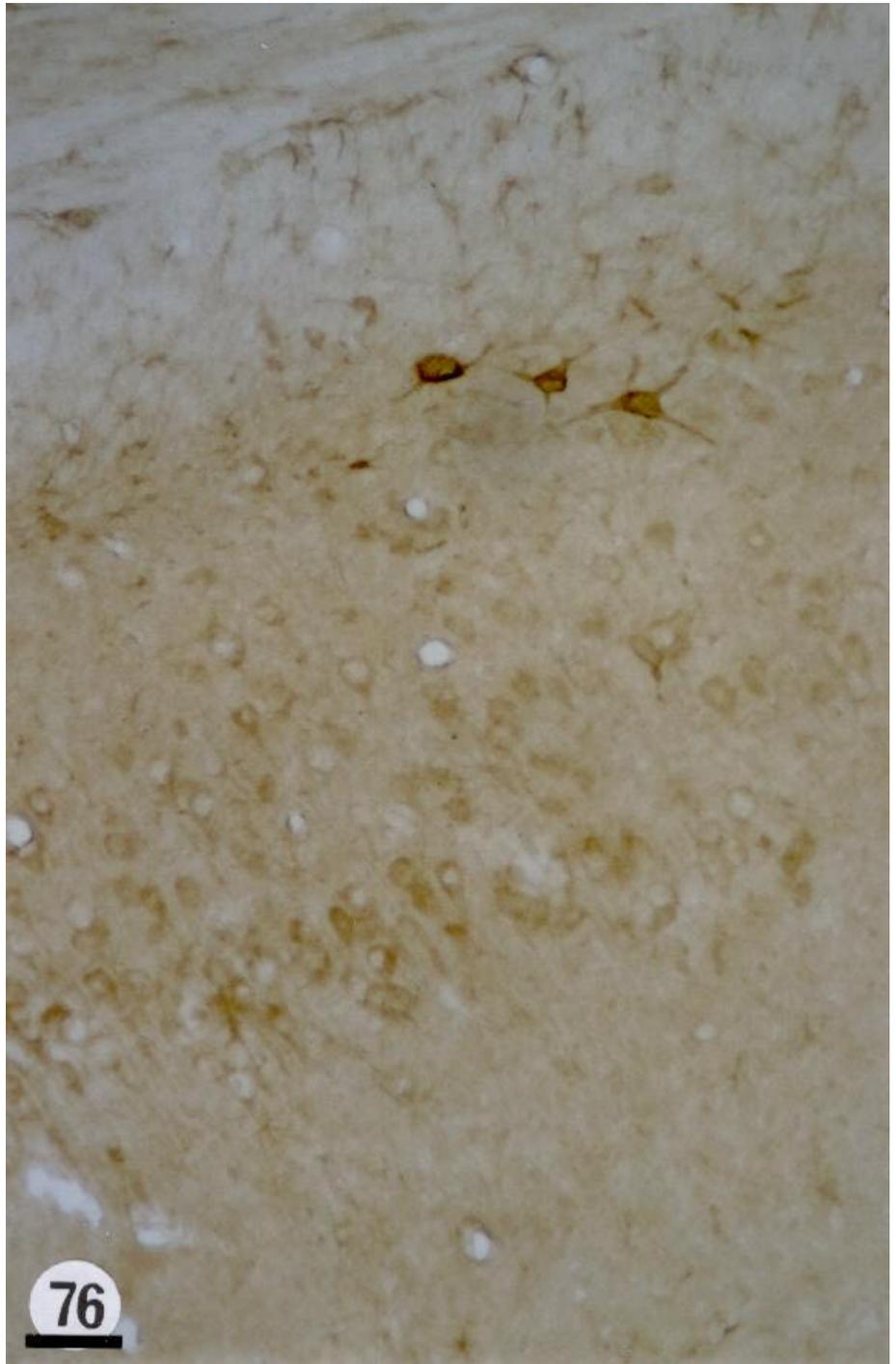
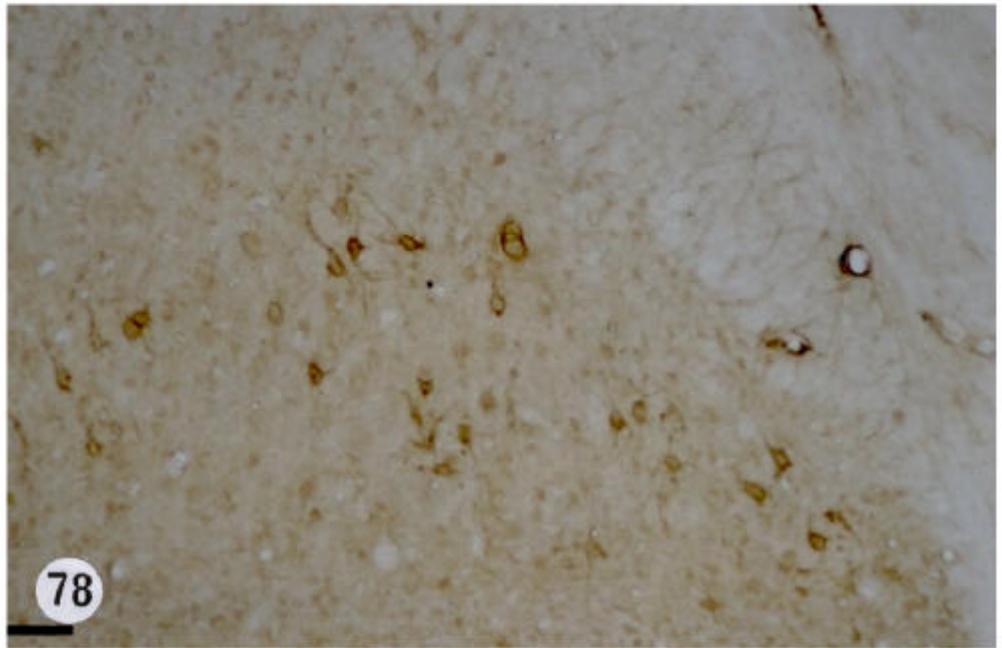


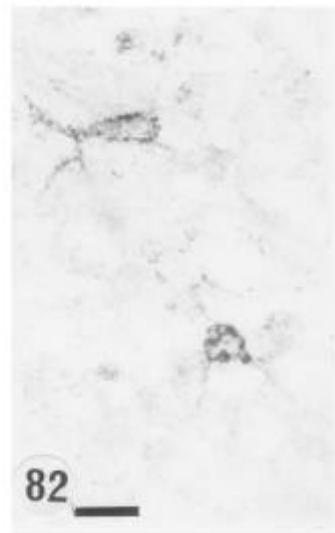
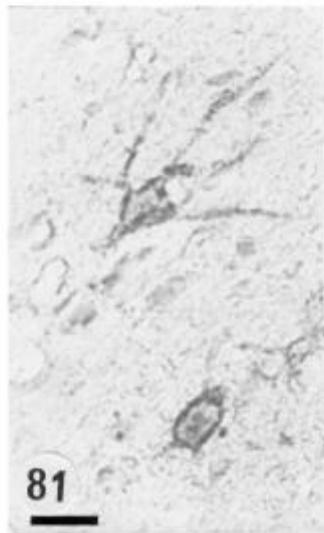
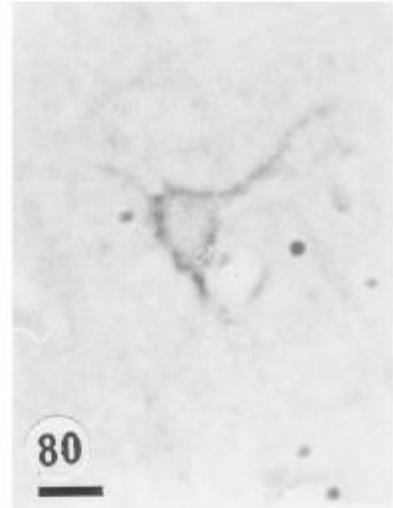
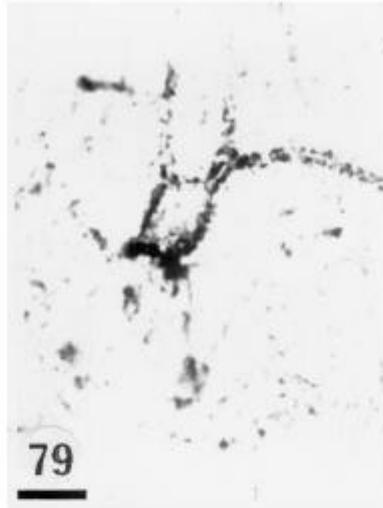
Fig. 76: Las mismas neuronas que figs. 74 y 75 vistas con coloración real. Escala de barras = 40,5 μ m.



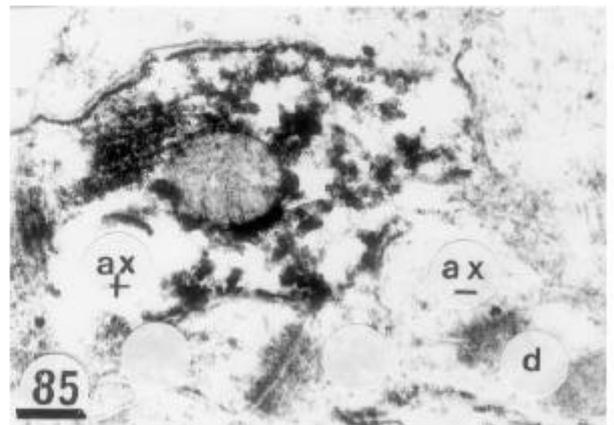
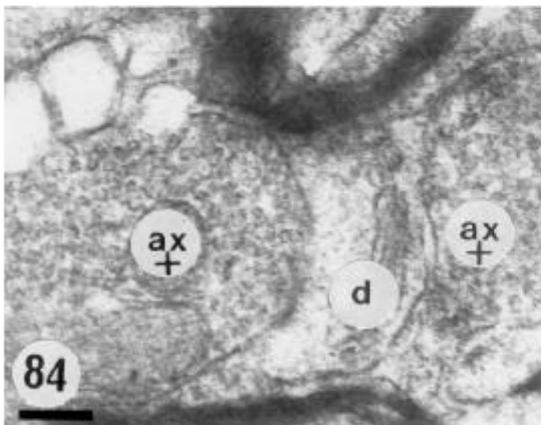
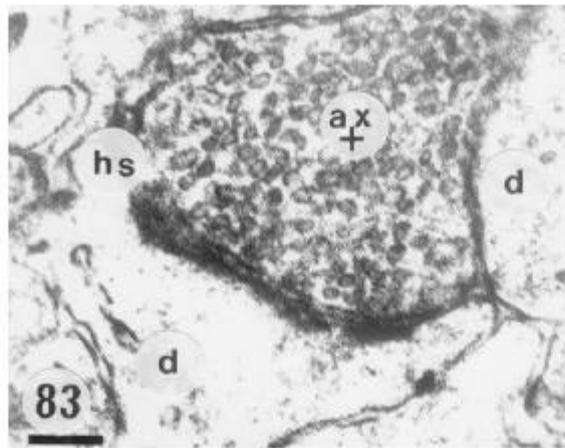
Figs. 77 y 78: Neuronas inmunopositivas en el estrato oriens hipocampal. Escala de barras = 50,5 μ m en fig. 77, 40,5 μ m. en fig. 78.



Figs. 79, 80, 81 y 82: En secciones semifinas se observan neuronas con reacción intensamente positivas en forma de granulaciones en el borde del pericarion y de las prolongaciones. Escala de barras = 25,5 μ m en figs 79- 81 y 35,5 en fig 82.



Figs. 83, 84 y 85: Observación al microscopio electrónico de reacción inmunohistoquímica intensamente positiva en el borde de las vesículas sinápticas de un axon (ax?) y en hendidura sináptica (hs). Las dendritas son negativas. Escala de barras = 0,5 μ m. en fig. 83, 0,67 μ m en fig. 84, 0,17 μ m en fig. 85.



NICOTINA

Fig. 86: Corteza frontoparietal de ratas no tratadas con nicotina. La actividad glioxilato-DH es especialmente intensa en las barras de Fields (capa cortical 3). La actividad es menos intensa en las demás capas corticales. Escala de barras = 80,5 μ m.

Figs. 87: Corteza frontoparietal de ratas tratadas con nicotina. Se observa incremento de actividad glioxilato-DH en todas las capas corticales, siendo ésta más intensa en las capas corticales 1, 2 y 3. La menor actividad se aprecia en la capa 4. Escala de barras = 80,5 μ m.

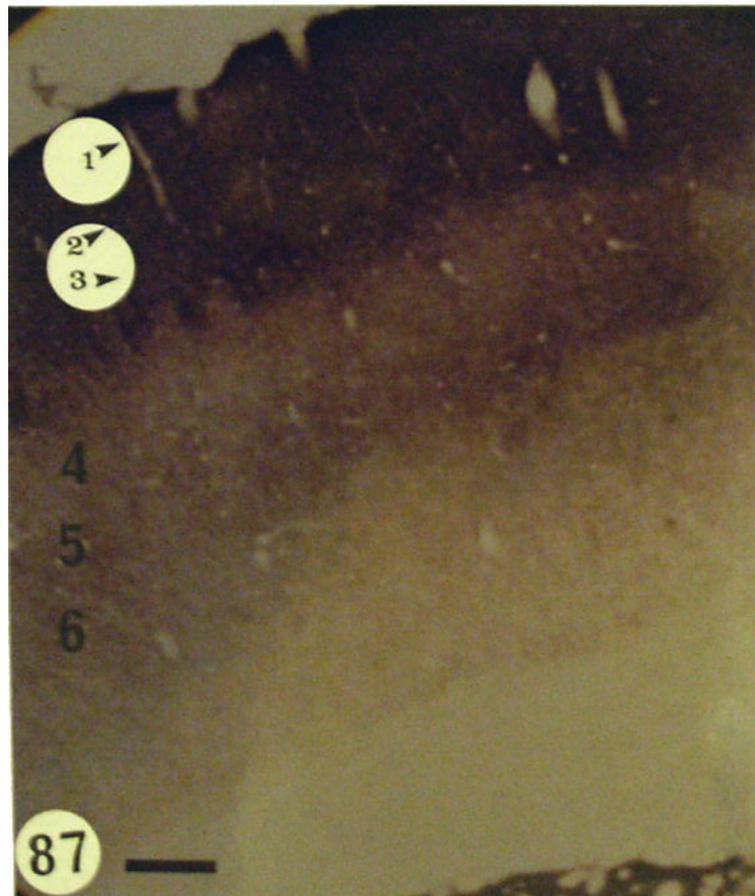
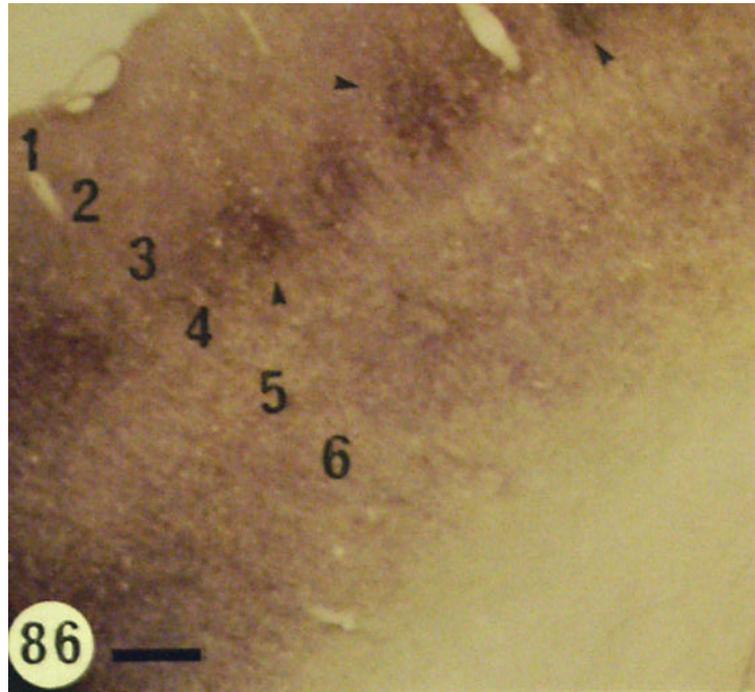
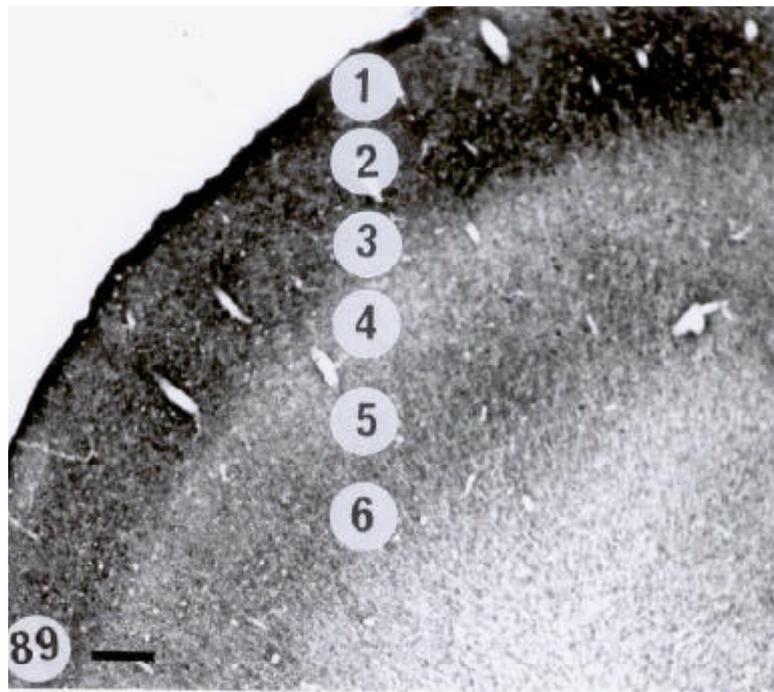
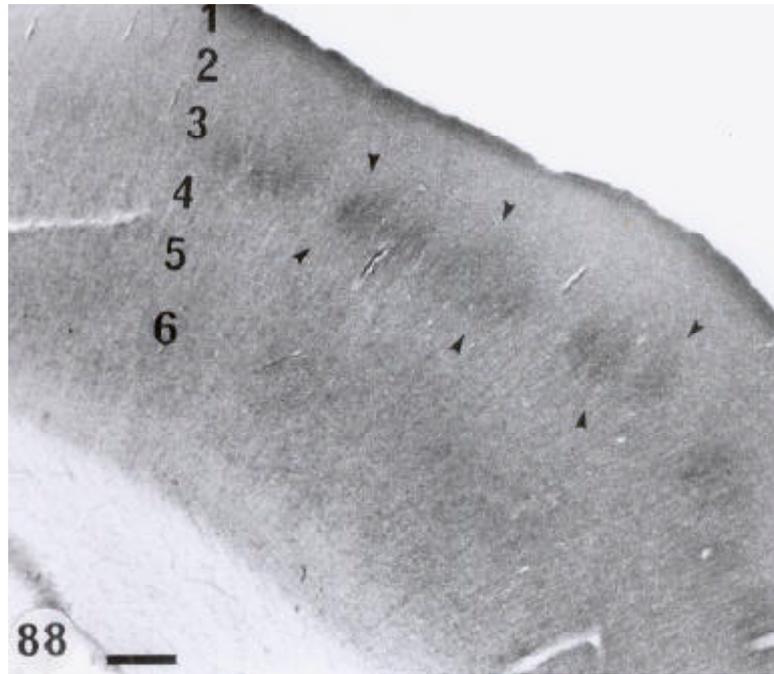


Fig. 88: Corteza frontoparietal de ratas no tratadas con nicotina. La actividad glioxilato-DH es especialmente intensa en las barras de Fields (capa cortical 3). La actividad es menos intensa en las demás capas corticales. Escala de barras = 80,5 μ m.

Fig. 89: Corteza frontoparietal de ratas tratadas con nicotina. Se observa incremento de actividad glioxilato-DH en todas las capas corticales, siendo ésta más intensa en las capas corticales 1, 2 y 3. La menor actividad se aprecia en la capa 4. Escala de barras = 80,5 μ m.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Addicks, K., Bloch, W., and Feelisch, M. "Nitric oxide modulates sympathetic neurotransmission at the prefunctional level". *Microsc. Res. Tech.* 29 (2): 161-168, 1994.
2. Agamanolis, D.P., Potter, J.L. and Lundgren, D.W. "Neonatal glycine encephalopathy: biochemical and neuropathologic findings". *Pediatr. Neurol.*, 9: 140-143, 1993.
3. Andy, V., Horvath., and Wanders, R. J. "Aminooxyacetic acid: a selective inhibitor of alanine-glyoxylate aminotransferase and its use in the diagnosis of primary hyperoxaluria type I". *Clin. Chim. Acta*, 243 (2): 105-114, 1995.
4. Axelsson, S., Björklund, A., Falck, B., Lindvall, O., and Svensson, L.A. "Glyoxylic acid condensation: a new fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. *Acta Physiol. Scand.* 87: 57-62, 1973.
5. Bais, R. Rofe, A.M. and Conyers, R. A. "Inhibition of endogenous oxalate production: biochemical considerations of the roles of glycollate oxidase and lactate deshydrogenase". *Clin. Sci.*, 76 (3): 303-309, 1989.

6. Bais, R. Rofe, A.M. and Conyers, R. A. "Investigation into the effect of glyoxylate decarboxylation and transamination on oxalate formation in the rat". *Nephron*, 57: 460-469, 1991.
7. Balmforth , A. J. and Thomson, A. "Isolation and characterization of glyoxylate dehydrogenase from the fungus sclerotium rolfsii". *Biochem. J.*, 218 (1): 113-118, 1984.
8. Bennet, J.P. and Snyder, S. H. "Serotonin and lisergic acid diethylamide binding in rat brain membranes. Relationship to postsynaptic serotonin receptors. *Mol. Pharmacol.*, 12: 373-389, 1978.
9. Björklund, A. Lindwall, O., Svensson, L. A. "Mechanisms of fluorophore formation in the histochemical glyoxilic acid method for monoamines". *Histochemie*. 32: 113-131, 1972.
10. Blin, J., Ray, C.A., Piercey, M.F., Bartko, J.J., Mourdian; M.M., and Chase; T.N. "Comparison of cholinergic drug effects on regional brain glucose consumption in rats and human by means of autoradiography and position emission tomography". *Brain Res.*, 635(1-2):196-202, 1994.

11. Borisova, N.A., Sapronova, A.Y., Proshlyakova, E. V. And Ugrumov, M.V. "Ontogenesis of the hypothalamic catecholaminergic system in rats: synthesis, uptake and release of catecholamines". *Neuroscience*,. 43: 223-229, 1991.
12. Bradbury, A. F., and Smyth, D. G. "Peptide amidation" Trends. *Biochem. Sci.*, 16 (3): 112-115, 1991.
13. Bringmann G, Feineis D, Hesselmann C, Schneider S, Koob M, Henscheler D. "A chemical concept for the therapy of glyoxylate-induced oxalurias (1)". *Life Sci* 50: 1597-1605, 1992.
14. Clarke, P, B., Mesolimbic dopamine activation the key to nicotine reinforcement. *Ciba Found. Symp.*, 152: 153-162, 1990.
15. Dahlstron, A., and Fuxe, K. "Evidence of the existence of monoamine - containing neurons in the central nervous system. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons". *Acta. Physiol. Scand.* (*suppl.*), 232: 1-55, 1964.
16. Danpure, C. J., Jennings, P. R., and Watts, R. W. "Enzymological diagnosis of primary hyperoxaluria type 1 by measurement of hepatic alanine: glyoxylate aminotransferase activity". *Lancet*. 1: 289-291, 1987.

17. Danpure, C. J., Jennings, P. R., Leiper, J.M., Lumb, M.J. Oatey P.B.
"Targeting of alanine: glyoxylate aminotransferase in normal individuals and its mistargeting in patients with primary hyperoxaluria type 1". *Ann NY Acad Sci* 804:477-490, 1996.
18. Danpure, C. J., Jennings, P. R., Mistry, J., Chalmers, R. A., Mc Kerrell, R. E., Blakemore, W. F., and Heath, M. F. "Enzymological characterization of a feline analogue of primary hyperoxaluria type 2: a model for the human disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 12 (4): 403-414, 1989.
19. Danpure, C. J., Pardue, P. E., Fryer, P., Griffiths, S., Allsop, Lumb, M. J., Guttridge, K. M., Jennings, P. R., Scheinman, J. I., and Mauer, S. M. "Enzymological and mutational analysis of a complex primary hyperoxaluria type 1 phenotype involving alanine: glyoxylate aminotransferase peroxisome-to-mitochondrion mistargeting and intraperxisomal aggeration". *AM. J. Hum. Genet.* 53 (2): 417-432, 1993.
20. Danpure, C.J. "Variable peroxisomal and mitochondrial targeting of alanine: glyoxylate aminotransferase in mammalian evolution and disease". *BioEssays*, 19: 317-326, 1997.
21. Danpure, C.J. "The molecular basis of alanine: glyoxylate aminotransferase mistargeting: the most common single cause of primary hyperoxaluria type 1." *J Nephrol.* Mar-Apr;11 Suppl 1:8-12. Review. 1998

22. Davis, W. L., and Goodman, D. B. "Evidence for glyoxylate cycle in human liver" *Anat. Rec.*, 234(4): 461-468, 1992.
23. Davis, W. L., Jones, R. G., Farmer, G. R., Dickerson T., Cortinas E., Cooper OJ., Crawford L., and Goodman, D. B. "Identification of glyoxylate cycle enzymes in chick liver. The effect of vitamin D3: citochemistry and biochemistry". *Anat. Rec.*, 227 (3): 271-284, 1990.
24. Davis, W. L., Jones, R G., Farmer, G. R., Matthews, J. L., and Goodman, D. B. "Glyoxylate cycle in the epiphyseal growth plate: isocitrate lyase and malate synthase identified in mammalian cartilage". *Anat. Rec.*, 223 (4): 357-362, 1989.
25. Davis, W. L., Matthews, J. L., and Goodman, D. B. "Glyoxylate cycle in the rat liver: effect of vitamin D3 treatment". *Faseb J.*, 3: 1651-1655, 1989.
26. Deady, L. W., Buckley, P. D., Bennet, A. F. and Blackwell, L.F. "Kinetics of inhibition and Hysteresis of sleep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase with glyoxylic acid. Further evidence relating to the two-site model for adehyde oxidation". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 143: 586-597, 1985.

27. Dixon H.B.F. and Fields, R. "Specific modification of NH₂-terminal residues by transamination". In: *Method in Enzymology*. Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N. (Eds.). Academic Press, New York, London. Vol XXV, pp: 409-419, 1972.
28. Dixon, H. B. F. "Transamination of a protein in the presence of acetate, glyoxalate and nickel ions." *Biochem. J.*, 103: 38, 1972
29. Domino EF, Minoshima S, Guthrie S, Ohl L, Ni L, Koeppe RA, Zubieta JK. Nicotine effects on regional cerebral blood flow in awake, resting tobacco smokers. *Synapse*. Dec 1;38 (3): 313-21. 2000
30. Elekes, K., Kemenes, G., Hiripi, L. Geffard, M., and Benjamin, P. R. "Dopamine immunoreactive neurones in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea Stagnalis*". *J. Comp. Neurol.*, 307 (2): 214-224, 1991.
31. Emson, P.C. and Lindway, O. "Distribution of putative neurotransmitter candidates in the mammalian central nervous system" *Prog. Neurobiol.*, 13: 61-166, 1979.
32. Emson, P.C. and Lindway, O. "Distribution of putative neurotransmitter in the neocortex" *Neuroscience*, 4: 1-30, 1979.

33. Fallon, J. H., Riley, J.N., and Moore, R. Y. "Substantia nigra dopamine neurons. Separate population project to neostriatum and allocortex". *Neurosci. Lett.*, 7: 157-162, 1978.
34. Fallon, J. H., Riley, J.N., Sipe, J.P. and Moore, R. Y. "The islands of Calleja: organization and connetions". *J. Comp. Neurol.*, 181: 375-396, 1978.
35. Fallon, J.H., Koziell, D.A., and Moore, R. Y. "Catecholamine innervation of the basal forebrain. II Amigdala, suprarhunal cortex and entorhinal cortex". *J. Comp. Neurol.*, 180: 509-532, 1978.
36. Felten, D. L., Felten, S. Y., Sladek, J. R. Jr., Notter, M.D. Carlson, S.L., Bellinger, D. L., and Dentistry, N. Y. "Fluorescence histochemical techniques for catecholamines as tools in neurobiology". *J. Microsc.*, 157 (pt3): 271-283, 1990.
37. Fields, R., and Dixon, H. B. F. "Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides , using 2, 4-dinitrophenilhydrazine". *Biochem. J.*, 121 (4): 587-589, 1971.
38. Frydl, V. "Zerebrorenale oxalate formation. A metabolic abnormality following parenteral infusions of carbohydrate exchange substances".

- Bezirkskranknauses Harr Bei Munchen, BRD. Zentral Allg. Pathol*, 133 (4): 369-376, 1987.
39. Fujiwara S, Noguchi T. "Degradation of purines: only ureidoglycolate lyase out of four allantoin-degrading enzymes is present in mammals". *Biochem J* 312: 315-318, 1995.
40. Gitelman DR, Prohovnik I. Muscarinic and nicotinic contributions to cognitive function and cortical blood flow. *Neurobiol Aging*, Mar-Apr; 13 (2): 313-8. 1992
41. Gragera, R.R., Martínez-Rodríguez, R., Capilla, J., De Miguel, E., Gómez de Segura, I., turégano, L., Alvarez, M.I., and Toledano, A. "Localization of glyoxylate dehydrogenase and glyoxylate-complex molecules in the rat prefrontal cortex: enzymohistochemical and immunocytochemical study". *J. Neurosci. Research* 59: 561-567, 2000.
42. Grenhoff J, Aston-Jones G, Svensson TH. Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol Scand*. Nov; 128 (3): 351-8. 1986
43. Hagishita, T., Yoshida, T., Izumi, Y., and Mitsunaga, T. "Immunological Characterization of serine-glyoxylate aminotransferase and hydroxypyruvate

- reductase from a methylotrophic bacterium, *Hyphomicrobium methylovorum* GM2". *Fems. Microbiol. Lett.*, 142 (1): 49-52, 1996.
44. Hanau S, Berteilli M. "Glyoxylate for affinity labelling of 6-phosphogluconate dehydrogenase". *Boll Soc Ital Biol Sper* 70: 135-141, 1994.
45. Hochster, R.M. and Quastel, J.M. (ed.) Metabolic inhibitors. A comprehensive treatise. Academic Press, New York, London. Vol. II, pp: 373-502, 1963.
46. Hodgson, A.J., Penke, B., Erdei, A., Chubb, Y.W. and Somogy, P. "Antisera to γ -aminobutyric acid. I. Production and characterization using a new model system". *J Histochem Cytochem*, 33: 229-239, 1985.
47. Hokfelt, T., Ljungdahl, A., Fuxe, K and Johansson, O. "Dopamine nerve terminals in the rat limbic cortex: aspects of the dopamine hypothesis of schizophrenia". *Science*, 184: 177-179, 1974.
48. Husic, D.W., and Tolbert, N. E. "NADH: hydroxypyruvate reductase and NADPH: glyoxylate reductase in algae: partial purification and characterization from *Chlamydomonas reinhardtii*". *Arch. Biochem. Biophys.*, 252: 398-408, 1987.

49. Kalaria RN, Homayoun P, Whitehouse PJ. Nicotinic cholinergic receptors associated with mammalian cerebral vessels. *J Auton Nerv Syst.* Sep; 49 Suppl: S3-7. 1994
50. Kim DJ., Smith SM. "Expression of a single gene encoding microbody NAD-malate dehydrogenase during glyoxysome and peroxisome development in cucumber". *Plant Mol Biol.* 26 (6):1833-1841, 1994.
51. Kuhn, R, Jerchel, D. "Über Invertseifen VII Mitteil: Tetrazolin Salze". *Ver. Deuts. Chem. Ger.* 74, 941-948, 1941.
52. Kulak, J.M., Nguyen, Th.A., Olivera, B.M. and Mc Intosh, J. M., "α-Conotoxin MII Blocks Nicotine-Stimulated dopamine release in rat striatal synaptosome". *J.Neuroscience*, (17) 14: 5263-5270, 1997.
53. Levitt, P. and Moore, R. Y. "Noradrenaline neuron innervation of the neocortex in the rat" *Brain Res.*, 139: 219-231, 1978.
54. Lidov, H. G. W., Grzanna, R., and Molliver, M. E. "The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat. An immunohistochemical analysis". *Neuroscience*, 5: 207-227, 1980.

55. Lindvall, O., and Björklund, A. "Dopamine and norepinephrine containing neuron systems: their anatomy in the rat brain". *Chemical Neuroanatomy*. Emson, P.C. (ed.). Raven Press, New York, pp: 229-255, 1983.
56. Lindvall, O., and Björklund, A. "The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholaminergic neurons". *Histochemistry*. 39: 97-127, 1974.
57. Liu, F., Thatcher JD, Barral JM, Epstein HF. "Bifunctional glyoxylate cycle protein of *Caenorhabditis elegans*: a developmentally regulated protein of intestine and muscle". *Dev Biol* 169:399-414, 1995.
58. Lorente de Nó, R. "Cerebral Cortex: Architecture, intracortical connections, motor projections". In *Physiology of the Nervous System* (J.F. Fulton, ed.) 3rd ed. Oxford University Press, New York and London. pp. 288-313, 1949.
59. Loy, R., Koziell, D. A., Lindsey, J. D., and Moore, R. Y. "Noradrenergic innervation of adult rat hippocampal formation". *J. Comp. Neurol.*, 189: 699-710, 1980.

60. Machado, C. R., Caliari, M. V., de Lana, M. and Tafuri, W.L. "Heart autonomic innervation during the acute phase of experimental American trypanosomiasis in the dog" *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59 (3): 492-496, 1998.
61. Mahul, P., Molliex, S., Auboyer, C., Levigne, F., Jospe, R., Dumont, A., Gilloz, A. "Role neurotoxique du glycoColle et de ses derivatives au cours de la resection transurethrale de la prostate". *Ann Fr Anesth Reanim* 12:512-514. 1994.
62. Mannaerts, G.P., and Van-Veldhoven, P.P., "Metabolic pathways in mammalian peroxisomes". *Biochimie*, 75 (3-4): 147-158, 1993.
63. Marín Padilla, M. Neurons of Layer I. A developmental Analysis. In Peters A, Jones EG, eds. *Cerebral Cortex, Vol I*, Plenum Press, New York and London, pp. 447-478, 1984.
64. Martínez-Rodríguez, Alonso, M.J., De Miguel, E., Gómez Segura, I., Gómez-Aguado, F., Picazo, A., Corcuera, M.T., Alvarez, M-I., and Toledano, A. "Synaptic immunolocalization of glyoxylate-complex molecules in the striate areas of the rat cerebral cortex: lith and electron microscopic studies". *J. of Neuroscience Research* 51:268-274, 1998

65. Martínez-Rodríguez, R., Grajera, R.R., Muñiz, E., De Miguel, E., Alonso, M. J. López Bravo, A., Gómez de Segura, I.A., Corcuera, M.T., Toledano, A., Rodrigo, J., and Martínez-Murillo, R. "Distribution of glyoxylate oxidoreductase activity in cortical and subcortical regions of the rat brain. A light microscopic histoenzymological study". *Cell. Mol. Biol.*, 42 (6): 873-880, 1996.
66. Martínez-Rodríguez, R., Muñiz, E., De Miguel, E., Gómez-Segura, I., Alonso, M. J. Toledano, R. R., and Grajera, R.R. "Glyoxylate oxidoreductase activity and glyoxylate-like molecules in the motor, somatosensory, cingulate and olfactory areas of the rat frontoparietal cortex. Histoenzymological and immunohistochemical study". *J. Brain Res.* 38: 61-70, 1997.
67. Masters, C. "Gluconeogenesis and the peroxisome". *Mol. Cell. Biochem.* 166 (1-2): 159-168. 1997.
68. Maul, D.M. and Schuster, S.M. "A comparison of the cytosolic and mitochondrial forms of asparagine-glyoxylate aminotransferase". *Arch. Biochem. Biophys.* 251 (2): 577-584, 1986.
69. Mc Cammon, M. T., Veenhuis, M., Trapp, S. B., and Goodman, J. M.. "Association of glyoxylate and beta oxidation enzymes with peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.*, 172 (10): 5816-5827, 1990.

70. Mc Cann, S. M., and Ojeda, S. R. "The role of brain monoamines, acetylcholine and prostaglandins in the control of anterior pituitary function. In : *Endocrinology*, L. J. de Groot, ed., pp. 41-54, Grune and Stratton, New York, 1979.
71. Mc Ilwain, H. "Biochemistry and the central nervous system". *London, Churchill Ltd*, 1-143, 1966.
72. Michel, G. (ed.) *Biochemical Pathways. Third Edition. Part. I. Boehringer Mannheim*. 1995.
73. Moore, R. Y. And Bloom, F. E. "Central catecholamine neuron systems" *Annu. Rev. Neurosci.*, 2: 113-168, 1979.
74. Morrison, J. H., Molliver, M.E., Grzanna, R., and Coyle, J. T. "Noradrenergic innervation patterns in three regions of medially cortex: an immunofluorescent characterization". *Brain Res. Bull.*, 4: 849-857, 1979.
75. Olschwka, J.A., Molliver, M.E., Grzanna, R., Rice, F. L., and Coyle, J. T. "Ultrastructural demonstration of noradrenergic synapses in the rat central nervous system by dopamine- β -hydroxylase immunocytochemistry" *J. Histochem.* 29: 271-280, 1981.

76. Parnavelas, J., and Mc Donald, J. K. "The cerebral cortex". In: *Chemical Neuroanatomy. P.C. Emson, ed.* pp. 505-549 Raven Press, New York, 1983.
77. Paszkowski, A. and Niedzielska, A. "Glutamate-glyoxylate aminotransferase from the seedings of rye". *Acta Biochem. Pol*, 36 (1): 17-19, 1989.
78. Paszkowski, A. and Niedzielska, A. "Serine-glyoxylate aminotransferase from the seedings of rye". *Acta Biochem. Pol*, 37 (2): 277-282,1990.
79. Pearse, A.G.E, *Histochemistry, theoretical and applied*, 4th ed., Churchill Livinstone, Edinburg , London, New York, 1980.
80. Poore RE, Hurst Ch, Assimos Dg, Holmes RP. "Pathways of hepatic oxalate synthesis and their regulation". *Am J Physiol* 272: C289-C294, 1997.
81. Popov VN, Volvenkin SV, Eprintsev AT, Igamberdiev AU. "Glyoxylate cycle enzymes are present in liver peroxisomes of alloxan-treated rats". *FEBS Lett.* Nov, 27; 440 (1-2): 55-8. 1998
82. Pretraluro, M., Pellegrino, S, Marangella, M, Cosseddu, D., Linari, F. "High-performance liquid chromatographic microassay for L-alanine: glyoxylate aminotransferase activity in human liver". *Clinical Chim Acta* 208: 183-192, 1992.

83. Purdue, PE., Lumb, MJ., Danpure, CJ. "Molecular evolution of alanine/gyoxylate aminotransferase 1 intracellular targeting. Analysis of the marmoset and rabbit genes". *Eur. J. Biochem.* 207:757-766. 1992.
84. Quayle, J.R., Keech, D.B., and Taylor, G.A.. "Carbon assimilation by *Pseudomonas oxaliticus*. 4. Metabolism of oxalate in cell-free extracts of the organism grown on oxalate". *Biochem. J.*, 78: 225-236, 1961.
85. Ramón y Cajal S.R., "Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammifères". *Cellule.* 7:125-176, 1891.
86. Ramón y Cajal, S.R. "Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés". *Matoine*, Paris, France. Vol 11: 519-646, 1911.
87. Ramón y Cajal, S.R. "Sobre la existencia de células nerviosas especiales de la primera capa de las circunvalaciones cerebrales". *Gaceta Médica Catalana*, pp. 225-228, 1890.
88. Retzius, G. Die Cajal schen Zellen der Grosshirnrinde beim Menschen und bey Säugetieren. *Biol. Untersuch*, 4:1-9, 1895.
89. Riekkinen P Jr, Riekkinen M, Sirvio J. Effects of nicotine on neocortical electrical activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* Nov; 267 (2): 776-84. 1993

90. Sakuraba, H., Fujiwara, S., and Noguchi, T. "Alanine-glyoxylate aminotransferase is present as the apoenzyme in the peroxisomes of chicken Kidney". *Biochem Biophys Res Commun* 161: 696-699. 1989
91. Sakuraba, H., Fujiwara, S., and Noguchi, T. "Metabolism of glyoxylate, the end product of purin degradation in liver peroxisomes of fresh water fish". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 229 (2): 603-606. 1996.
92. Sharma, V., Schwille, PO. "Oxalate production from glyoxylate by lactate dehydrogenase *in vitro*: inhibition by reduced glutathione, cysteine, cysteamine". *Biochem Int* 27:431-438, 1992.
93. Sidhu, H., Gupta, R., Thind, S.K., and Nath, R. "Oxalate metabolism in thiamine- deficient rats". *Ann. Nutr. Metab.*, 31 (6): 354-361, 1987.
94. Small, J. R., Scadding, J. W. And Landon, D. N. "A fluorescence study of changes in noradrenergic sympathetic fibres in experimental peripheral nerve neurons" *J. Neurol. Sci.*, 100 (1-2): 98-107, 1990.
95. Sokoloff L. Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system. *Fed Proc.* Jun; 40 (8): 2311-6. 1981.

96. Sokoloff, L. "The deoxyglucose method for the measurement of local glucose utilization and the mapping of local functional activity in the central nervous system". *Int Rev Neurobiol.* 25: 287-393, 1981.
97. Solanto M.V. Neuropharmacological mechanisms of simulant drug action in attention deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav. Brain. Res.*, 94 (1): 127-152, 1998.
98. Steinbuch, H. W. M. And Nieuwenhuys, R. "The raphe nuclei of the rat brainstem. A cytoarchitectonic and immunohistochemical study. In *Chemical Neuroanatomy . P.C. Emson, ed.*, pp 131-207, Raven Press, New York, 1983.
99. Sternberger LA. *Immunocytochemistry 2nd ed. New York: John Wiley & Sons*, pp: 104-169, 1979.
100. Stoker, J.W., Malanasi, F, and Trucco, M. "Enzyme immunoassay for detection of hybridoma products". In: *Lefkowitz, H and Pernis, B (ed.): immunochemical methods. Vol. II.* Academic Press, New York, pp: 299-308, 1981.
101. Swchenko, P. E., and Swanson, L. W. "Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. *Science*, 214: 685-687, 1981.

102. Takada, Y., Mori, T. And Noguchi, T. "The effect of vitamin B₆ deficiency on alanine-glyoxylate aminotransferase noenzymes in rat liver". *Arch. Biochem. Biophys.*, 229 (1): 1-6, 1984
103. Theron, J.J., and van Papendorp, D. H. "Peroxisomal diseases, a survey". *S. Afr. Med. J.*, 86 (6): 685-690, 1996.
104. Turégano, L., Martínez-Rodríguez, R., Alvarez M.I., Grajera RR, Gómez de Segura, A., De Miguel, E and Toledano, A. "Histochemical study of acute and chronic intraperitoneal nicotine effects on several glycolitic and Krebs cycle deshydrogenase activities in the frontoparietal cortex and subcortical nuclei of the rat Brain". *Journal of Neuroscience Research*. 64: 626-635, 2001.
105. Wanders, R.J., Ruiten, J., Van Roermund, C. W., Schutgens, R. B., Ofman, R., Jurriaans, S., and Tager, J.M. "Human liver L-alanine-glyoxylate aminotransferase: characteristics and activity in controls an hyperoxaluria type I patients using a simple spectrophotometric method" *Clin. Chem. Acta.*, 189 (2): 139-144, 1990.
106. Warburton, A.L., and Santer, R.M. "Sympathetic and sensory innervation of the urinary tract in young adult and aged rats: a semi-quantitative

- histochemical and immunohistochemical study". *Histochem. J.* 26 (2): 127-133, 1994.
107. Watts RW. "Alanine glyoxylate aminotransferase deficiency: biochemical and molecular genetic lessons from the study of a human disease". *Adv Enzyme Regul* 32: 309-327, 1992.
108. Wilson, G.N. "Structure-function relationships in the peroxisome: implications for human disease". *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 46 (3): 288-298, 1991
109. Yanagawa, M., Maeda-Nakai, E., Yamakawa, K., Yamamoto, I., Kawamura, J., Tada, S., and Ichigama, A. "The formation of oxalate from glycolate in rat and human liver". *Biochim. Biophys Acta*, 1036 (1): 24-33, 1990.
110. Yanagihara, Y., Kobayashi, S. and Mifuchi, I. "Sugar synthesis in *Leptospira* II. Presence of glyoxylate cycle enzymes". *Microbiol-Immunol.*, 28 (5): 529-534, 1984.
111. Zocchi, E. Polvani, Z., and Guida, L. "Gyoxylic acid prevents NAD⁺ and NADPH depletion in K562 cels cultured at limiting dilution". *Biochemical and Biophysical Research communications*, 173 (1): 179-185, 1990.