

Progresividad de los efectos del glutamato en el sistema nervioso central: Aspectos experimentales y clínicos

Manuel José Rodríguez Allué

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Tesis doctoral

**PROGRESIVIDAD DE LOS EFECTOS DEL GLUTAMATO
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: ASPECTOS
EXPERIMENTALES Y CLÍNICOS**

Manuel José Rodríguez Allué

Barcelona, Mayo de 2000

3. Materiales y metodología general

MATERIALES

ANIMALES

Excepto para los experimentos de la sección 4.5, se trabajó con ratas (*Rattus norvegicus*) macho albinas de la cepa Sprague-Dawley, con un peso comprendido entre los 275 y los 300 gramos al inicio de los experimentos. Los animales se mantuvieron enjaulados, bajo un ciclo controlado día-noche de 12 horas y con libre acceso a comida y agua. Fueron facilitados por el Estabulario de la *Facultat de Medicina* de la U.B. y manipulados en sus instalaciones observando siempre la reglamentación sobre la manipulación de animales de experimentación aprobada por *La Generalitat de Catalunya* (Decreto 214/1997 del DOGC nº 2450).

El estudio descrito en la sección 4.5 se realizó con ratas macho de la cepa Long-Evans obtenidas en las *Charles River Breeding Farms* (St. Constant, Québec, Canadá). Se mantuvieron enjauladas y fueron manipuladas según la normativa del *Canadian Council for Animal Care* y la *McGill University*.

TEJIDOS HUMANOS

Las muestras de tejido cerebral se obtuvieron procedentes de autopsias, a través del *Servei d'Anatomia Patològica* del Hospital *Sant Joan de Deu* de Barcelona y gracias a la amable colaboración de la Dra. Victoria Cusí. La obtención de dichas muestras se realizó siempre con la aprobación del Comité de Ética del hospital.

FÁRMACOS ESPECÍFICOS

☞ El ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propionico (AMPA), con un PM de 267,1 g/mol era un potente aminoácido excitador que interactúa selectivamente con los receptores de glutamato/quiscuálico en el sistema nervioso central. Era soluble en H₂O y etanol, se guardó almacenado a 4°C y fue suministrado por Sigma.

☞ La 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) con un PM de 116,9 g/mol era un antagonista específico de los receptores A₁ de la adenosina. Era soluble en etanol y DMSO, se guardó a 4°C y fue suministrado por Sigma.

ANTICUERPOS

☞ El anticuerpo anti-GFAP era un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína ácida fibrilar glial purificada de la médula espinal de cerdo. Se guardaba a -30°C en alícuotas de trabajo y fue suministrado por Sigma.

☞ El anticuerpo anti-ChAT era un anticuerpo monoclonal de ratón contra la colina acetiltransferasa purificada del cerebro de rata. Se guardaba a -30°C en alícuotas de trabajo y fue suministrado por Chemicon International.

☞ El anticuerpo anti-parvalbúmina era un anticuerpo monoclonal de ratón contra la parvabúmina purificada del músculo de carpa. Se guardaba a -30°C en alícuotas de trabajo y fue suministrado por Sigma.

☞ El anticuerpo anti- $\gamma\gamma$ -enolasa era un anticuerpo policlonal de conejo contra la enolasa específica de neuronas purificada del cerebro buey. Se guardaba a -30°C en alícuotas de trabajo y fue suministrado por Chemicon International.

☞ El suero normal de cabra (NGS) así como el resto de anticuerpos y reagentes necesarios para la serie de reacciones inmunohistoquímicas se guardaba a la temperatura aconsejada por la casa comercial y fue suministrado por Sigma.

RADIOLIGANDOS

☞ El 1-(-2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinolinocarboxamida o PK-11195, era un antagonista del receptor periférico de benzodiazepinas con un PM de 352.86 g/mol y un punto de fusión de 136-138°C. Era soluble en etanol e insoluble en agua o soluciones básicas. La forma tritiada se guardó a -20°C y fue suministrada por NEN.

☞ El quinuclidinil bencilato L-[bencílico-4,4'-³H] ([³H]QNB) era un antagonista de los receptores muscarínicos de la acetilcolina con un PM de 337,4 g/mol y un punto de fusión de 164°C. Era sensible a la luz, soluble en etanol y tenía una tasa de descomposición del 3% cada doce meses. Se guardó a -20°C y fue suministrado por NEN.

☞ El [³H]muscimol era un antagonista de los receptores A₁ del GABA con un PM de 115,0 g/mol. Era sensible a la luz, muy soluble en agua y metanol, algo menos en etanol. Tenía una tasa de descomposición del 0.3% por semana durante las primeras 27 semanas acelerándose posteriormente. Se guardó a -20°C y fue suministrado por Amersham.

☞ El (+)[³H] dizocilpine maleato ([³H]MK-801) era un antagonista de los receptores NMDA del glutamato con un PM de 221,3 g/mol. Era soluble en agua, etanol y soluciones acuosas ácidas. Tenía una tasa de descomposición del 3% anual, se guardó a -20°C y fue suministrada por ARC

☞ El [³H]lazabemide era un inhibidor reversible de la monoamino oxidasa B (MAO B) con un PM de 238,01 g/mol. Era soluble en agua y etanol. Tenía una tasa de descomposición anual del 8% y se guardó a -20°C. Era una molécula sintetizada en los laboratorios Hoffmann-La Roche (Basel, Suiza) que nos fue generosamente facilitada por el Dr. J. Grayson Richards.

SOFTWARE ESPECÍFICO

El análisis y cuantificación de imágenes se realizó con el programa OPTIMAS[®] v4.0 (BioScan Inc) para Windows. El estudio estadístico se realizó con los paquetes estadísticos STATGRAPHICS[®] v6.0 (STSC Inc.) e INSTAT v2.04a (GraphPad Software) ambos para MS-DOS.

OTROS COMPUESTOS

La hematoxilina de Mayer, la isolectina B₄, el yoduro de acetilcolina, el violeta de cresilo y el verde rápido eran de Sigma, mientras que el rojo de alizarina era de Merck. Los inhibidores PK-11195, sulfato de atropina, (+)-MK-801-maleato, y L-deprenil fueron suministrados por RBI, lo mismo que el CGS-19755, finalmente la etopropazina era de Sigma.

El resto de compuestos se obtuvo de diversas casas comerciales y era de la máxima pureza disponible. Se utilizó agua MilliQ para todas las soluciones, las cuales se conservaron a 4°C hasta su utilización excepto en los casos en que el protocolo exigía lo contrario.

METODOLOGÍA GENERAL

ANESTESIA DE ANIMALES

Se utilizaron dos procedimientos de anestesia diferentes ya fuera para el sacrificio o la cirugía de los animales. Para su sacrificio, se introdujo la rata en un cristalizador con la atmósfera saturada de éter dietílico (Panreac) antes de ser decapitada. Esto se hizo así en todos los animales excepto en las ratas destinadas al estudio de las actividades enzimáticas. En este caso, además de no presentar ningún estrés, las ratas debían ser sacrificadas en estado de consciencia. También fueron anestesiadas con éter dietílico todas las ratas antes de ser sometidas a perfusión transcardíaca.

Para las experiencias de cirugía, las ratas fueron anestesiadas con equitesina. Este anestésico es una mezcla de hidrato de cloral y pentobarbital sódico. La mezcla se preparaba protegida de la luz y era:

a) Hidrato de cloral (Panreac)	2,12 g
Propilenglicol (Panreac)	21,4 mL
b) Pentobarbital sódico (RBI)	485 mg
Etanol (Sharlau)	5,75 mL
c) $MgSO_4 \times 7 H_2O$ (Panreac)	1,06 g
Agua destilada	21,8 mL

Mezclar (a + b) + c y guardar a 4°C protegida de la luz.

La administración era intraperitoneal con jeringuillas de insulina, en dosis de 0,12 unidades por cada gramo de rata.

LESIÓN ESTEREOTÁXICA

Mediante estereotaxia es posible acceder de forma muy precisa a núcleos específicos del cerebro de rata. Bien sea para introducir un electrodo, una fibra de microdiálisis o inyectar una solución en el núcleo escogido.

La lesión se realizó con un aparato de estereotaxia (David Kopf, Carnegie Medicine) y los animales se operaron siguiendo siempre las coordenadas de referencia definidas en el Atlas de Paxinos *et al.* (1986) (figura 3.1). La barra de fijación de los incisivos estaba situada a -3,3 mm de altura. La diferencia de altura de los puntos *bregma* y *lambda* nunca superó los 0,3 mm. Mientras que la altura del núcleo se calculó a partir de la duramadre.

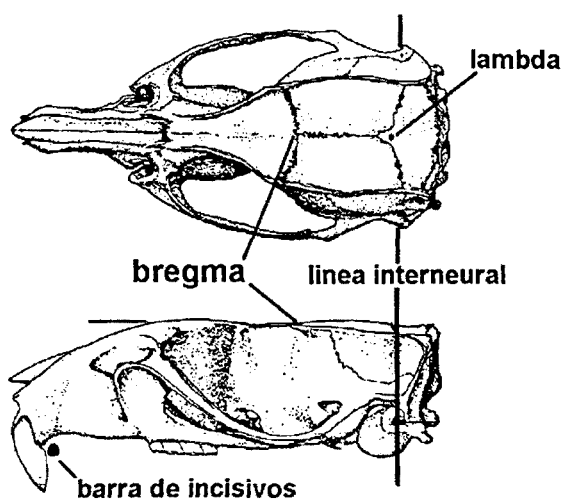


Figura 3.1: Vistas superior y lateral del cráneo de una ratona. El esquema incluye los puntos *bregma* y *lambda* así como otros utilizados de referencia en la operación estereotáxica. Modificado del Atlas de Paxinos *et al.* (1986).

Tras comprobar la total anestesia de la ratona, ésta se colocó en el aparato de estereotaxia. En la piel de la cabeza del animal se practicó con el bisturí una incisión anteroposterior, dejando al descubierto el cráneo y sus puntos *bregma* y *lambda*. Tras comprobar que el animal estaba bien situado y calcular las coordenadas de inyección, se practicó una trepanación en el cráneo con un torno de dentista, se introdujo la aguja hasta el lugar adecuado y se esperó por espacio de 5 minutos. Después se procedió a la inyección de la solución escogida y, tras 5 nuevos minutos de espera, se procedió a extraer la aguja. Finalmente se practicaron 3 puntos de sutura en la herida y se devolvió la ratona a su jaula bajo un foco de luz hasta que despertara. En ese momento se le dio a beber un poco de agua.

Lesión del septo medio

Las coordenadas escogidas para lesionar en el septo medio fueron:

- ☞ 0,7 mm rostral a bregma.
- ☞ -1,1 mm lateral a bregma.
- ☞ 5 mm ventral desde la duramadre.

La aguja se introdujo con una inclinación de 10° respecto a la vertical debido a la posición central del septo medio (figura 3.2) y a la necesidad de no perforar el seno longitudinal pues, de romperlo, la rata podría morir por la hemorragia.

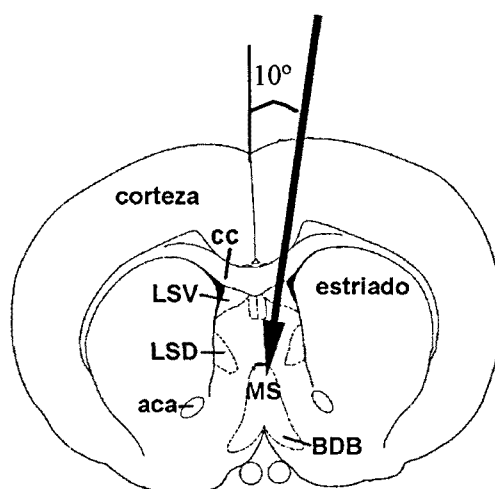


Figura 3.2: Dibujo esquemático de la sección coronal del cerebro de rata a la altura donde se realizó el estudio (0,7 mm. rostral de *bregma*). La figura está adaptada del Atlas de Paxinos *et al.* (1986). La flecha se corresponde con el lugar de inyección: aca, comisura anterior; BDB, banda diagonal de Broca; cc, cuerpo calloso; LSD, septo lateral dorsal; LSV, septo lateral ventral; MS septo medio.

MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL *IN VIVO*

Fundamento de la técnica

La microdiálisis intracerebral es una técnica neuroquímica destinada a obtener y cuantificar niveles de neurotransmisores, metabolitos, sustancias endógenas y fármacos o toxinas administradas en un núcleo cerebral determinado. El sistema de microdiálisis se basa en el implante cerebral de una cánula con dos

sistemas de canalización, uno situado en el interior del otro (Ungerstedt 1984). Los dos sistemas están separados del tejido cerebral por una membrana de diálisis que permite el intercambio selectivo de sustancias (figura 3.3). La membrana de diálisis varía en permeabilidad según el material del que se componga y el paso de las sustancias se realiza en los dos sentidos, lo que permite no sólo la obtención de moléculas endógenas sino también la administración local de fármacos en el área de implante.

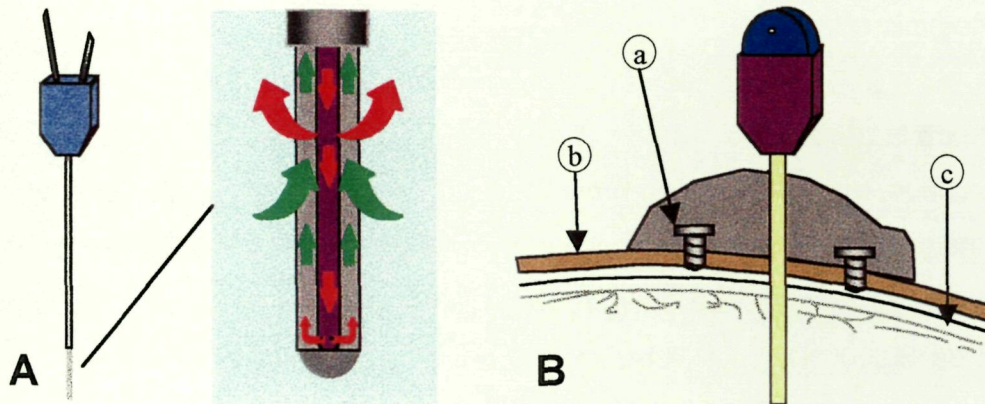


Figura 3.3: Esquema de una fibra de microdiálisis intracerebral (A) y de cómo se implanta en el cerebro (B) con ayuda de una cánula. (A) En la parte final de la sonda se encuentra una membrana de longitud variable que permite el intercambio de sustancias de bajo peso molecular entre el líquido de perfusión y el medio extracelular. (B) Para implantar la cánula se introducen los tornillos (a) en el cráneo de la ratona (b) y ayudan a que el cemento fragüe. De este modo la cánula queda fijada a la superficie del hueso atravesando la duramadre (c) y llegando hasta el núcleo de interés.

La idea de implantar una sonda de microdiálisis genera amplias posibilidades farmacológicas. Así, mediante esta técnica es posible la evaluación de la actividad de receptores de neurotransmisores, evaluación que dependerá de la medida en que estos neurorreceptores controlen y modifiquen los niveles extracelulares de neurotransmisores y metabolitos. Por otro lado, la sonda ha de implantarse en el animal anestesiado, pero la obtención de muestras del perfundido puede efectuarse en el animal todavía anestesiado o despierto y con libertad de movimientos, lo que permite la realización de experimentos de carácter crónico.

Desde el punto de vista metodológico la microdiálisis intracerebral *in vivo* consiste en la colocación por estereotaxia de una sonda de diálisis en el núcleo de interés. Posteriormente se administra el líquido de perfusión con un sistema de

bombeo, y se recoge por el extremo libre de la fibra. Finalmente, el análisis del perfundido obtenido se realiza mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o radioinmunoensayo. Deben tenerse en cuenta tres aspectos importantes: Por un lado, para asegurar el flujo unidireccional es necesario el uso de un sistema de bombeo con un flujo bajo (entre 0,1 y 7 $\mu\text{L}/\text{min}$) (Meana 1996); además, el líquido de perfusión ha de ser lo más próximo posible en pH y composición al líquido cefalorraquídeo (LCR); y para acabar, el sistema de análisis ha de ser muy sensible y con la posibilidad de trabajar con volúmenes muy pequeños, del orden de algunos microlitros.

Implante de la fibra

Las fibras implantadas eran el modelo CMA/12 (Carnegie Medicin) con una membrana de 0,5 mm de diámetro y 4 mm de longitud. El diámetro de la sonda era de 0,64 mm, su longitud de 14 mm, un volumen interno de 3 μL y un poro de filtración de 20.000 Da. Las fibras incorporaban una cánula que se implanta con anterioridad y hace más simple la operación. De este modo la fibra se puede implantar con el animal despierto y puede ser utilizada en varias experiencias. El implante se realizó con un aparato de estereotaxia David Kopf aplicando los mismos criterios que los seguidos en la lesión estereotáxica.

Dos días antes de la microdiálisis se implantó la cánula. Tras asegurar la total anestesia de la rata, esta se colocó en el aparato de estereotaxia. En la piel de la cabeza se le practicó con el bisturí una incisión anteroposterior, dejando al descubierto el cráneo y sus puntos *bregma* y *lambda*. Tras comprobar que el animal estaba bien situado y calcular las coordenadas de implante, se practicó una trepanación con un torno de dentista junto al cual se insertaron dos tornillos (Servei Estació). Tras romper la duramadre, se introdujo la cánula hasta el lugar adecuado y se fijó al cráneo y los tornillos con cemento dental (TAB 2000, Kerr®) (figura 3.3). Una vez el cemento había fraguado se practicaron dos puntos de sutura en la herida y se devolvió la rata a su jaula bajo un foco de luz hasta que despertara. En ese momento se le dio a beber un poco de agua.

El lugar de implante fue el hipocampo dorsal, siendo las coordenadas escogidas:

- ☞ 5,2 mm caudal a bregma.
- ☞ \pm 4,6 mm lateral a bregma.
- ☞ 2,46 mm ventral desde la duramadre.

El signo de la coordenada lateral variaba pues la mitad de las fibras fueron implantadas en el hipocampo derecho y la otra mitad en el izquierdo. Por su parte, la coordenada ventral indicaba el punto hasta donde llega la cánula; al introducir la fibra, ésta bajará desde allí 4 mm más como queda indicado en la figura 3.4

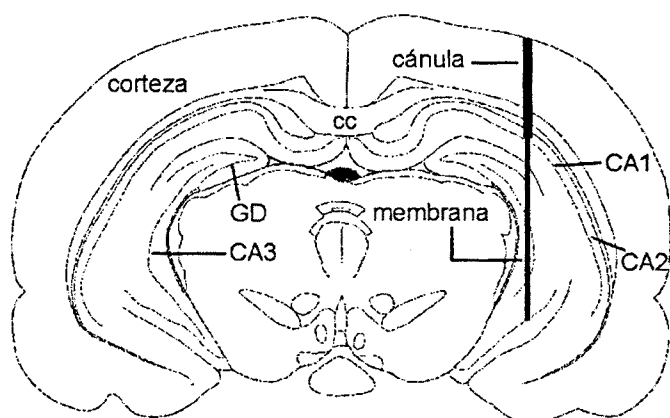


Figura 3.4: Dibujo esquemático de la sección coronal del cerebro de rata a la altura donde se realizó la microdiálisis (5,2 mm caudal de *bregma*). A la mitad de las ratas se les implantó la fibra en el lado derecho y a la otra mitad en el izquierdo. Modificado del Atlas de Paxinos *et al.* (1986). CA1, región CA1 del hipocampo; CA2, región CA2 del hipocampo; CA3, región CA3 del hipocampo; GD, circunvolución dentada.

Microdiálisis intracerebral

El día anterior al experimento (24 horas antes de la microdiálisis) y con la rata despierta se extraía la guía metálica de la cánula, en su lugar se insertaba la fibra y se devolvía el animal a la jaula. 12 horas después, se conectaba la rata al sistema (figura 3.5). En primer lugar se enlazaba la entrada de la fibra con el sistema de perfusión el cual ya estaba en marcha y consistía en una bomba de infusión (KdScientific, modelo 220) que impulsaba los líquidos de perfusión contenidos en jeringas Hamilton. La conexión entre la jeringa y la fibra se realizaba mediante un tubo de polietileno (Carnegie Medicin) con un diámetro interno de 0.28

mm y un volumen muerto de $0,65 \mu\text{L}/\text{cm}$. La conexión del tubo a las jeringas y la fibra se hacía con un conector FEP (Carnegie Medicin). Del mismo modo se conectaba la fibra al sistema de recogida, consistente en un tubo eppendorf instalado en un recipiente de corcho blanco.

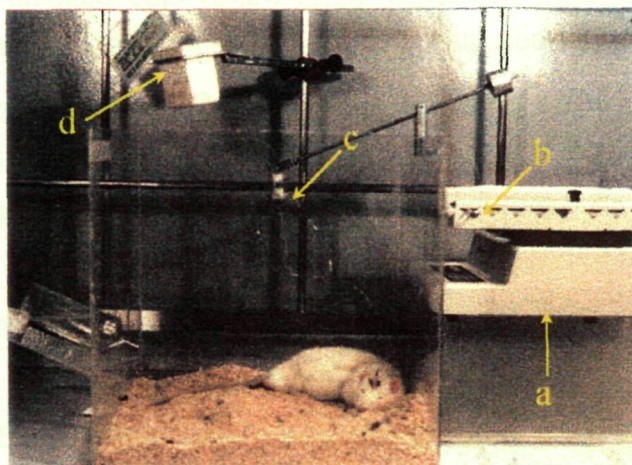


Figura 3.5: El sistema de microdiálisis. Mediante la bomba de infusión (a) se inyecta el LCR artificial contenido en una jeringa Hamilton (b) en el cerebro del animal despierto, un *swivel* (c) evita que los cables de conexión se enrollen. Finalmente el dializado se recoge en un recipiente con hielo (d).

Se depositaba la rata en la jaula, con libre acceso a comida y agua, dializándola con LCR artificial a una tasa de $0,2 \mu\text{L}/\text{min}$ hasta el día siguiente. De este modo el tejido se acostumbraba a la perfusión, evitando una reacción astrogial exagerada y demasiado temprana, todo ello con el fin de evitar artefactos debidos al implante de la fibra.

El día del experimento, una hora después de que se encendiera la luz en el estabulario, se cambiaba el flujo de diálisis a $2 \mu\text{L}/\text{min}$ y se esperaba por espacio de una hora. Entonces se comenzaba a recoger las muestras cada 20 minutos en tubos eppendorf introducidos en hielo y por espacio de 8 horas. Una vez obtenida, cada muestra se congelaba inmediatamente a -30°C .

A fin de evitar la variabilidad que pudiera generar el momento del día, todas las experiencias fueron realizadas en la misma franja horaria. Además, las ratas no fueron manipuladas durante la experiencia salvo por accidente o imprevisto, en ese

caso se desechaban las muestras pertinentes. Lo mismo ocurría si algún sonido estridente alteraba el comportamiento normal del animal.

Los líquidos de perfusión eran:

☞ LCR artificial:

126,5 mM de NaCl,
2,4 mM de KCl,
1,1 mM de CaCl₂,
0,83 mM de MgCl₂,
27,5 mM de NaHCO₃,
0,5 mM de KH₂PO₄,
0,5 mM de Na₂SO₄,
5,8 mM de glucosa

☞ LCR artificial con potasio 0,1 M:

Consiste en la solución LCR artificial pero con una concentración 0,1 M de KCl

☞ LCR artificial con DPCPX 0,1 μM:

Consiste en una solución LCR artificial que contiene DPCPX a una concentración de 0,1 μM

Tanto la glucosa como las sales fueron suministradas por Merk. Las soluciones se guardaban como máximo durante una semana a -80°C y se filtraban antes de cada uso.

Finalmente, cabe señalar que se comprobó el rendimiento de las fibras CMA/12 mediante el dializado *in vitro* de soluciones estándar de aminoácidos y purinas. El dializado se realizó a temperatura ambiente, en seis de las fibras utilizadas, a un flujo de 2,0 μL/min y estando los aminoácidos y purinas disueltos a concentraciones similares a las fisiológicas (Ungerstedt 1984). De éste modo se corregía la cuantificación de estos compuestos en el hipocampo. La tabla 3.1 indica el rendimiento encontrado.

Tabla 3.1: Porcentaje de captación *in vitro* de las fibras CMA/12 para los compuestos de interés

Aminoácido	Rendimiento	Purina	Rendimiento
Asp	24 ± 3 %		
Glu	22 ± 2 %	Ac. úrico	50 ± 5 %
Ser	21 ± 4 %	Hipoxantina	13 ± 1 %
Gln	26 ± 2%	Inosina	20 ± 2 %
Gly	20 ± 2%	Adenina	18 ± 2 %
Tau	27 ± 3 %	Adenosina	20 ± 1 %
GABA	25 ± 2%		

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN

Fundamento de la técnica

Se podría definir la cromatografía como una técnica de separación de los solutos de una mezcla basándose en la diferente velocidad con la que se mueve cada uno de ellos a través de un medio poroso (fase estacionaria), arrastrados por un disolvente en movimiento (fase móvil). Existen muchos tipos diferentes de cromatografía pero todos ellos implican la interacción entre estos tres componentes, la mezcla de solutos, la fase móvil y la fase estacionaria, dependiendo la magnitud de estas interacciones del método utilizado. La cromatografía líquida se desarrolló a partir de la cromatografía de fase reversa. Supongamos que, sobre un plato, se deposita una cantidad de agua y sobre ella una de un disolvente orgánico inmiscible en agua. Si añadimos un soluto, se disolverá en ambos medios dependiendo de su solubilidad relativa (coeficiente de reparto). Si esperamos a que el sistema llegue al equilibrio, podremos eliminar la fase acuosa y reemplazarla por otra sin soluto. Ahora, el soluto que estaba disuelto en la fase orgánica volverá a repartirse entre las dos fases y así sucesivamente. En una columna de fase inversa cada una de estas zonas de intercambio entre fases se llama plato teórico. En la cromatografía líquida, el tampón de elución constituye la fase móvil siendo la fase estacionaria, la resina de intercambio.

Obviamente, a mayor número de platos teóricos mejor resolución y separación de compuestos. Sin embargo una columna demasiado larga puede aumentar en exceso los procesos de difusión pasiva. Una alternativa es disminuir el poro de la fase estacionaria y así aumentar la superficie de intercambio. En este caso, ni la gravedad ni las bombas peristálticas son suficientes para hacer pasar la fase móvil por la columna. Se suelen, pues, utilizar potentes bombas que impulsen la fase móvil a lo largo de la columna la cual suele ser metálica para evitar roturas. De éste modo el sistema es capaz de aguantar altas presiones.

Un sistema de HPLC consta de varios instrumentos (figura 3.6): una bomba que asegure un flujo continuo de la fase móvil a través de la columna de fase reversa; entre la bomba y la columna incluirá un inyector que permita introducir la mezcla de solutos en el sistema; tras la columna un detector que dé una respuesta eléctrica, calibrada y precisa al paso de cualquier sustancia; un integrador que

dibuje el cromatograma, cuantifique y analice la separación; y finalmente, un controlador encargado de mantener y controlar el flujo y todo lo relativo a la fase móvil.

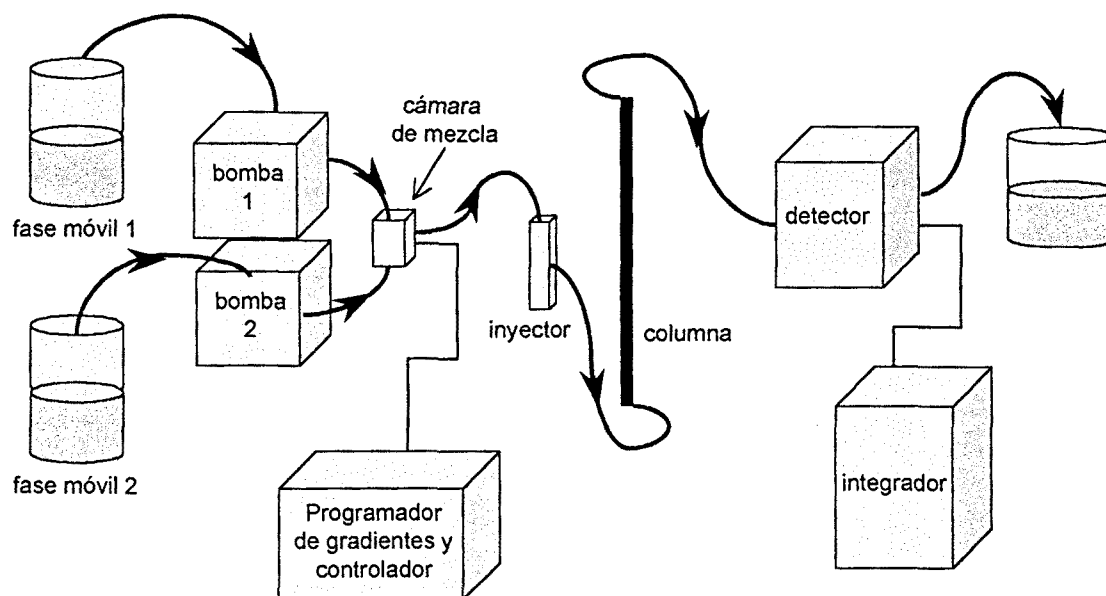


Figura 3.6: Esquema de un sistema de HPLC. Las flechas gruesas indican la dirección de flujo de la fase móvil mientras que las líneas de trazo fino indican conexiones eléctricas. El controlador de gradientes puede coordinar la actuación de más de una bomba con lo que es posible crear gradientes de flujo de varias fases móviles.

Detección de aminoácidos en sistema de gradiente

Se utilizó HPLC con detección de fluorescencia después de la derivatización con O-ftaldialdeido (OPA) (Lindroth *et al.* 1979). El proceso se realizaba a temperatura ambiente siendo los aminoácidos que se detectaron: Asp, Glu, Ser, Gln, Gly, Tau y GABA. La serina, que no se considera un neurotransmisor, se incluyó en el estudio como control de los cambios no específicos.

Los aminoácidos no poseen ninguna propiedad que produzca una señal que se pueda detectar por lo que se modifican formando derivados. Por ejemplo, mediante una reacción de derivatización para obtener un compuesto que sea fosforescente y emita una señal proporcional a la concentración del aminoácido a detectar. El reactivo que se utilizó era el OPA siendo el medio de reacción:

OPA (Sigma)	27 mg
Tetraborato sódico (38 g/L, pH 9,5) (Merk)	6,02 mL
Ácido 3-mercaptopropiónico (Sigma)	45,6 μ L

Metanol (Sharlau)

0,675 mL

Preparar como mínimo 24 horas antes de utilizarse, guardar a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Para la reacción se mezclaban 15 μ L de muestra con 5 μ L de homoserina 10 μ M y 10 μ L de reactivo OPA y se dejaban durante 1 minuto a 4°C. Se añadían 10 μ L de ácido acético al 5% a fin de reducir el pH de la solución y así proteger la resina de la columna. Una vez agitado, se inyectaban 25 μ L en el sistema de HPLC. La homoserina constituía un control de la reacción de derivatización en todas las muestras.

Para cuantificar se obtuvo una recta de calibración en el rango de concentraciones de las muestras de dializado. El contenido en aminoácidos de las muestras analizadas se calculó por el área de los picos obtenidos, utilizando como estándares una mezcla de la homoserina con todos los aminoácidos a analizar (figura 3,7).

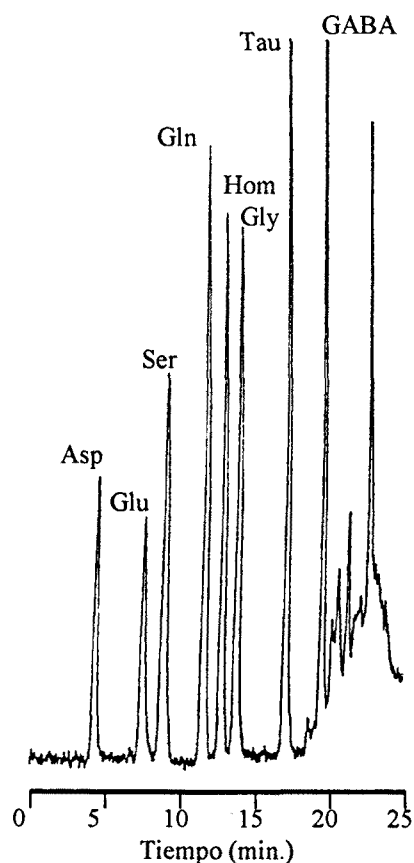


Figura 3.7: Cromatograma de separación del estándar de aminoácidos. Los tiempos de retención en minutos son: 4,14 para el Asp, 6,81 para el Glu, 8,54 para la Ser; 11,71 para la Gln; 12,93 para la homoserina; 13,93 para la Gly; 17,49 para la Tau y 20,06 para el GABA. Los picos finales se corresponden a los restos del reactivo OPA.

Protocolo 3.1: Detección de aminoácidos por HPLC en sistema de gradiente

- 1.- La fase estacionaria: Columna Lichrosorb C-18 (fase reversa) de 25 cm de longitud, 4 mm de diámetro y partículas de 10 μm (Scharlau), con una precolumna de las mismas características y 3 cm de longitud (Scharlau).
- 2.- La fase móvil era una mezcla de dos soluciones.
 Solución A: Acetato sódico (Merk) 4,101 g
 Metanol (Scharlau) 50 mL
 Alcohol isopropílico (Panreac) 12,5 mL
 Enrasar a 1 L con agua destilada y ajustar el pH a 5,96
 Solución B: Metanol al 70% en agua destilada
- 3.- La mezcla de estas dos soluciones no era constante en el tiempo al igual que no lo era el flujo de paso de la fase móvil. Se estableció un gradiente cíclico (tabla 3,2) con un periodo de 30 minutos, tiempo suficiente para separar los aminoácidos y volver a estabilizar la columna en las condiciones iniciales.

Tabla 3,2: Sistema de gradiente de flujo utilizado para separar los aminoácidos

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% Solución A	% Solución B
0	1,1	90	10
5	1,1	90	10
15	1,1	50	50
19	1,1	0	100
20,5	1,1	0	100
22	0,8	60	40
26	0,8	90	10
29	1,0	90	10
31	1,1	90	10

Tanto el cambio de flujo como de fase móvil se realizaba de forma lineal.

- 4.- El detector era fluorimétrico (Waters, modelo 420).
- 5.- El volumen de inyección era de 15 μL

Detección de purinas

Se utilizó HPLC con detección ultravioleta, modificando protocolos previos (Ballarín1991b, Hagberg1987) El proceso se realizaba a temperatura ambiente siendo las purinas que se detectaron: Ácido úrico, hipoxantina, inosina, adenina y adenosina.

Para cuantificar se obtuvo una recta de calibración en el rango de concentraciones de las muestras de dializado. El contenido en purinas de las muestras analizadas se calculó por el área de los picos obtenidos, utilizando como estándar una mezcla de las moléculas estudiadas (figura 3,8).

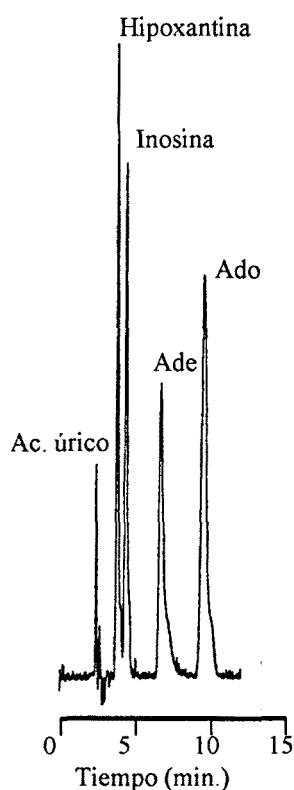


Figura 3.8: Cromatograma de separación del estándar de purinas. Los tiempos de retención son: 2,65 para el ácido úrico; 4,21 para la hipoxantina; 4,72 para la inosina; 7,59 para la adenina y 9,70 para la adenosina.

Protocolo 3.2: Detección de purinas por HPLC

- 1.- Fase estacionaria: columna μ -boundapack C-18 (fase reversa) de 30 cm de longitud, 4 mm de diámetro y partículas de 10 μ m (Scharlau).
- 2.- Fase móvil: solución de Tris-HCl 0,1M (pH 8,15) con un 10% de metanol
- 3.- Usar un flujo constante de 0,9 mL/min.
- 4.- Detector de luz ultravioleta (Waters, modelo 484) con la longitud de onda fijada a 260 nm.
- 5.- Inyectar 100 μ L de muestra

DISECCIÓN Y TRATAMIENTO DEL TEJIDO CEREBRAL

Fijación

Los procedimientos de fijación tisular consisten en la interrupción de la degradación celular, tratando de conservar la morfología y composición del tejido lo más próxima posible a como se encontraba antes de la muerte del organismo. En función de las características del estudio microscópico que se vaya a realizar se distinguen dos tipos de fijación tisular: a) la fijación histológica, que pretende principalmente la conservación de la arquitectura y estructura de los tejidos y células y b) la fijación histoquímica, para la cual es más trascendente preservar la composición molecular y bioquímica de los tejidos. En el segundo caso se pueden realizar estudios microscópicos que incluyen datos sobre el funcionamiento tisular, tales como autoradiografía, enzimohistoquímica o inmunohistoquímica.

Los métodos de fijación se clasifican, a su vez, en físicos y químicos. La fijación por métodos físicos se utiliza para realizar estudios morfológicos o funcionales en los que se requiera conservar intactos las propiedades enzimáticas o antigénicas. Esta fijación se basa en la ultracongelación y la clave estriba en su rápida realización. Por ello se utiliza el nitrógeno líquido (-180°C) el isopentano (-120°C) o la nieve carbónica (-80°C) y la utilización de congeladores o criostatos, por muy potentes que sean, está desaconsejada.

En la fijación química se utilizan líquidos que desnaturalizan e insolubilizan las proteínas, lo que bloquea la autólisis por inactivación enzimática. Además algunos de estos líquidos fijadores impiden el crecimiento bacteriano. En nuestro estudio utilizamos el paraformaldehído (PFA) como agente fijador. Una molécula con gran penetración en el tejido, usada tradicionalmente a una concentración del 4% (p/v) (Fox *et al.* 1987) y que desnaturaliza las proteínas por reticulación; es decir, induce a la rotura masiva de los puentes de hidrógeno de las proteínas y facilita la formación de una malla reticular polipeptídica. Como mordiente se utilizó el ácido pícrico que facilita este tipo de reacción y produce una óptima contracción de los tejidos que favorece su procesamiento histológico.

Cabe aquí mencionar que el uso del ácido pícrico se presenta como un inconveniente en los estudios de marcaje inmunohistoquímico de los

aminoácidos neurotransmisores tales como el Glu y el GABA (Comunicación personal del Dr. Kiss) aconsejándose su sustitución por el glutaraldehído.

En los estudios histológicos se siguieron dos protocolos diferentes para la extracción y fijación del tejido cerebral, bien fuera éste destinado a experiencias de autorradiografía *in vitro*, bien lo fuera para técnicas de tinción histológica. En el primer caso, previa anestesia, las ratas se decapitaban, su cerebro se extraía rápidamente, se congelaba con nieve carbónica y se guardaba a -80°C hasta su utilización. En el segundo, las ratas recibían una perfusión transcardíaca de una solución fijadora antes de extraer el cerebro.

Perfusión transcardíaca

El sistema de perfusión consistía en dos botellas, una con tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M y la otra con la solución fijadora, colgadas de una percha para goteros. Las botellas estaban comunicadas mediante sendos goteros a una cánula. Era necesario asegurarse de que el sistema funcionara correctamente, que no hubiera burbujas y que estuviera totalmente limpio de solución fijadora.

Tras asegurar la total anestesia del animal, se practicaba una incisión longitudinal que abarcaba desde el tórax hasta la mitad del abdomen de la rata. A continuación se abría la caja torácica asegurando el máximo espacio posible para la libre manipulación del corazón. Inmediatamente después se cortaba el diafragma apareciendo al descubierto el corazón y los pulmones. Mientras el corazón de la rata todavía latía, se abría la llave de paso del PBS y se introducía la cánula en el ventrículo izquierdo, procurando que en ningún momento se parara el flujo de PBS. Acto seguido se cortaba la vena cava cerca de su conexión con la aurícula derecha, para abrir una salida de evacuación en el sistema. Se dejaba pasar PBS durante unos 15 minutos (flujo aproximado 20 mL/min) con lo que se limpiaba de sangre todo el sistema circulatorio del animal. Seguidamente, se pasaba a perfundir con la solución fijadora durante otros 15 minutos al mismo flujo.

Finalmente, tras parar el sistema, se extraía el cerebro de la rata y se postfijaba mediante una incubación de 2 horas en la misma solución fijadora y a 4°C. Tras ello, se le transfería a una solución crioprotectora durante tres días también a 4°C (cambiando la solución cada 24 horas), lo que preparaba al cerebro para su posterior congelación con nieve carbónica.

Las soluciones que se utilizaban eran:

☞ PBS 0,01 M		☞ Solución fijadora	
Na ₂ HPO ₄	1,15 g	Consiste en una solución de PBS 0,01 M al	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,26 g	4% (p/v) de PFA y 0,6% (p/v) de ácido pícrico.	
NaCl	8,0 g		
KCl	0,2 g	☞ Solución de crioprotección	
Agua destilada	0,1 L	Consiste en una solución de PBS 0,01 M al	
		15 % (p/v) de sacarosa y 0,01% (p/v) de azida	
Ajustar el pH a 7,4		sódica.	

Tanto la sacarosa como las sales y el ácido pícrico fueron suministradas por Merk, mientras que el PFA y la azida sódica eran de Sigma. Las soluciones se preparaban el día anterior a su uso, se filtraban y se guardaban en la nevera a 4°C.

Las secciones de tejido congelado fresco adheridas a un portaobjetos también se pueden fijar de forma química. Estas secciones postfijadas podrán, de este modo, ser procesadas para tinciones que exigen la fijación química tisular.

Protocolo 3.3. Fijación con paraformaldehído de las secciones de cerebro congelado

Para preparar la solución de PFA se mezclan 40 g de PFA en 1 L de PBS (0,01 M, pH 7,4). La mezcla se ha de calentar (nunca más de 56°C) para facilitar la disolución. Una vez disuelto, se añaden 0,65 g de ácido pícrico, se deja atemperar y se guarda a 4°C.

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Lavado en PBS 0,01 M, 30 min.
- 3.- Incubar en la solución de PFA a 4°C, 3 min.
- 4.- Dos lavados en PBS, 2 X 10 min.

Obtención de cortes por microtomía

Para todos los estudios histológicos, se realizaron cortes coronales seriados de los cerebros congelados. Las secciones eran de 12 µm de grosor y se obtenían con un criostato (Leica, modelo Jung Frigocut 2800E). La temperatura del criostato durante la obtención de las secciones se mantuvo a -22°C para conservar correctamente los cerebros. Las secciones se obtenían a la altura del septo medio y del hipocampo y se recolectaban sobre portaobjetos sin tratar si pertenecían a cerebros congelados sin fijación química; mientras que, si el

cerebro estaba fijado por perfusión, las secciones se adherían a portaobjetos gelatinizados. En cualquier caso, los portaobjetos se guardaban hasta el día del experimento a -20°C como máximo.

Protocolo 3.4: Gelatinización de portaobjetos.

- 1.- Mezclar: 1g de gelatina.
0,1 g de $KCr(SO_4)$.
1 L de agua destilada.
- 2.- Calentar hasta disolver (nunca más de 60°C).
- 3.- Filtrar y dejar reposar 20 minutos.
- 4.- Sumergir los portaobjetos en la solución filtrada y dejar secar en la estufa protegidos del polvo.

TINCIONES HISTOLÓGICAS

La filosofía de las tinciones histológicas se fundamenta en la coloración más o menos específica de los tejidos o alguno de sus componentes con el fin de una fácil visualización e identificación de la arquitectura y composición del tejido. De las tres utilizadas en este trabajo, la tinción de Nissl es la más extendida, rutinaria y tradicional en el estudio del tejido nervioso. El colorante es una molécula básica y soluble en agua (normalmente violeta de cresilo, azul de toluidina o azul de metileno) que tiñe las moléculas basófilas de las células principalmente los ácidos nucleicos.

Protocolo 3.5. Tinción de Nissl

- 1.- Baño en alcohol 95° + formaldehído (1:1), 5 min.
- 2.- Baño en alcohol 95°, 2 min.
- 3.- Baño en cloroformo + alcohol 95° + éter dietílico (1:1:8), 10 min.
- 4.- Baño en alcohol 95°, 2 min.
- 5.- Baño en alcohol absoluto, 2 min.
- 6.- Baño en xilol, 5 min.
- 7.- Baño en alcohol absoluto, 2 min.
- 8.- Baño en alcohol 95°, 2 min.
- 9.- Tinción con solución filtrada de violeta de cresilo (1‰ p/v en H_2O , pH 3,5), 10 min.
- 10.- Baño en alcohol 95°, 2 min.
- 11.- Baño en alcohol absoluto, 2 min.
- 12.- Baño en xilol, 10 min.
- 13.- Montaje en DPX.

La del rojo de alizarina, por su parte, es una tinción utilizada desde los años 50 (Mcgee Russel 1958) y que colorea específicamente los metales calcio y bario. Es una tinción de rutina de tejidos osificados o de procesos de calcificación. El método aquí utilizado incluye una coloración de contraste con verde rápido que tiñe el tejido conjuntivo y permite la localización de las áreas de calcificación sobre los núcleos cerebrales. El principal inconveniente de esta molécula es su presunta actividad cancerígena deducida a partir de su semejanza con otros compuestos.

Protocolo 3.6. Tinción contrastada del rojo de alizarina

Es posible utilizar esta tinción tanto en secciones congeladas frescas como fijadas con PFA.

- 1.- Lavado en tampón Tris-HCl (0,05 M, pH 7,6), 5 min.
- 2.- Tinción con solución filtrada de rojo de alizarina (1% p/v en Tris-HCl) 2 min.
- 3.- Lavado en tampón Tris-HCl, 30 s.
- 4.- Tinción con solución filtrada de verde rápido (0,2% p/v en Tris-HCl), 30 s.
- 5.- 2 baños en acetona, 2 x 10 s.
- 6.- Baño en acetona-xilol (1:1), 15 s.
- 7.- Baño en xilol, 10 min.
- 8.- Montaje en DPX.

Finalmente, se realizó la tinción con hematoxilina. Esta molécula se utiliza como parte de la más extendida y popular tinción histológica, la de hematoxilina-eosina y es ideal para localizar las células en el tejido. Se une específicamente al ADN y, al entrar en contacto con sales, colorea de azul los núcleos celulares. Esta especificidad nuclear la hace ideal como tinción de contraste en los experimentos de inmunohistoquímica que es para lo que se utilizó aquí.

Protocolo 3. 7. Tinción con hematoxilina

- 1.- Lavado con agua destilada, 5 min.
- 2.- Tinción con Hematoxilina de Mayer, 2-3 min.
- 3.- Lavado con agua corriente del grifo, 10 min.
- 4.- Deshidratación:
 - 2 baños en alcohol 70°, 2 x 2 min.
 - 2 baños en alcohol 96°, 2 x 2 min.

- 2 baños en alcohol absoluto, 2 x 10 min.
- 2 baños en xilol, 2 x10 min.
- 5.- Montaje en DPX.

Histoquímica enzimática

Hoy es posible identificar, directamente sobre el tejido, la localización celular de la actividad de multitud de enzimas. Además esta localización puede llegar a ser cuantitativa, lo que permite estimar la distribución en el tejido de la actividad de esos enzimas. En uno de esos métodos, el más extendido de los histoquímicos, todos los sustratos y cosustratos son dispuestos en disolución solución sobre las secciones de tejido. El enzima de la sección actuará como catalizador de la reacción y uno de los productos de dicha reacción puede ser inmovilizado y hecho visible al microscopio.

La localización histoquímica de la acetilcolinesterasa que realizamos aquí se basa en el método clásico de Koelle *et al.* (1949) que utiliza la acetiltiocolina como sustrato. Esta molécula al degradarse da como resultado ácido acético y tiocolina que, en presencia de cobre, forma un compuesto cristalino e insoluble en agua. Este compuesto por su parte, al reaccionar con sulfuros (normalmente H₂S, Na₂S ó (NH₄)₂S) adquiere un color marrón visible en el microscopio.

Protocolo 3.8. Localización histoquímica de la actividad acetilcolinesterasa

Todas las secciones utilizadas eran de cerebros congelados sin perfundir.

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Incubación a temperatura ambiente en una solución 4 mM de yoduro de acetiltiocolina en tampón Acético-Acetato (50 mM, pH 5,0) que contiene CuSO₄ 4 mM, glicina 16 mM y etopropazina 8 µM, 16 horas.
- 3.- Dos lavados rápidos en acetato sódico 50 mM, pH 7,5 a temperatura ambiente, 2 x 1 min.
- 4.- Revelado en una solución al 1% (p/v) de Na₂S en agua, pH 7,5, 10 min.
- 5.- Dos lavados rápidos en acetato sódico 50 mM, pH 7,5 a temperatura ambiente, 2 x 1 min.
- 6.- Postfijación en una solución al 4% (p/v) de PFA en PBS 0,01M, 8 horas.
- 7.- Dejar secar las secciones.
- 8.- Deshidratación (protocolo 3.4)
- 9.- Montaje en DPX.

La etopropazina era un inhibidor de la butirilcolinesterasa, se disolvía en alcohol y al igual que el yoduro de acetiltiocolina, era fotosensible. El sulfuro de sodio emitía gases tóxicos al disolverse y la solución había de prepararse bajo la campana justo antes de usar.

Histoquímica de lectinas

Tradicionalmente se conoce como lectinas a aquellas proteínas vegetales que tienen la propiedad de aglutinarse sobre los eritrocitos de los mamíferos. Una lectina puede unirse a dos o más glucoproteínas de la superficie de la célula y además mantener unidas varias células. Se ha comprobado que, mientras algunas lectinas se unen a todos los glóbulos rojos, otras lectinas lo hacen de forma específica a algunos carbohidratos de esas glucoproteínas, estén en el eritrocito o donde fuere. Así, se puede utilizar esta molécula para detectar algunos tipos celulares en función de los carbohidratos que contengan. Por ejemplo, las células microgliales se unen a la lectina de *Phaseolus vulgaris L.* o a la de *Ricinus communis L.* que son lectinas con alta afinidad por residuos galactosil.

Los métodos histoquímicos que utilizan lectinas tienen mucho en común con los métodos inmunohistoquímicos, básicamente en la detección y localización de la lectina (ver páginas siguientes). Al ser proteínas de peso molecular alto (entre 20.000 y 300.000 Da) se les puede enganchar de forma covalente alguna molécula fácilmente detectable. Estas moléculas suelen ser fosforescentes, como la fluoresceína y la rodamina, o también enzimas que catalizan reacciones colorimétricas, como la peroxidasa de rábano (HRP) o la fosfatasa alcalina (ver sección de inmunohistoquímica), aunque también existen métodos de detección radiológicos e inmunológicos.

Protocolo 3.9. Tinción histoquímica de la isolectina B₄

Si las secciones eran de tejido congelado y cortado sin fijación química, era necesario postfijar los cortes (protocolo 3.1), y luego inhibir la actividad peroxidasa del tejido cerebral mediante el procedimiento:

- 1.- Incubación en una solución al 0,3% (v/v) de H₂O₂ en Metanol, 10 min.
- 2.- Tres lavados en PBS 0,1M (pH 7,4), 3 x 5 min.
- 3.- Proceder con el protocolo de tinción histoquímica a partir del paso 3.

Si eran secciones de tejido fijado por perfusión se procedía como sigue:

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.

- 2.- Lavar en PBS 0,1 M (pH 7,4), 10 min.
- 3.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la Isolectina B₄, a una concentración de 8 µg/mL en PBS 0,1M que contiene NGS al 1% (v/v), thimerosal al 0,04% (p/v) y tritón X-100 al 0,2% (v/v), 16-20 horas.
- 4.- Tres lavados con PBS, 3 x 5 min.
- 5.- Incubación a oscuras en una solución de PBS 0,1 M que contiene DAB al 0,03% (p/v) y H₂O₂ al 0,006% (v/v), 15 min.
- 6.- Lavado con agua destilada, 10-30 min.
- 7.- Deshidratación (protocolo 3.5)
- 8.- Montaje en DPX.

LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

Fundamento de la técnica

Mediante el proceso de tinción inmunohistoquímica es posible, utilizando anticuerpos, la localización de antígenos en tejidos para su examen bajo el microscopio. Es ésta una técnica que puede ser muy útil e informativa constituyendo un puente entre los estudios bioquímicos y los anatómicos. Para el diseño de un experimento de inmunohistoquímica se deben tener en cuenta dos factores: En primer lugar, por supuesto, las propiedades del anticuerpo que será utilizado y en segundo las del antígeno a detectar, ya que algunos antígenos son extremadamente lábiles y ha de actuarse con cuidado para preservarlos. La forma más común de preservar la estructura y contenido del tejido es utilizar alguna substancia como el PFA que fije las proteínas y, a la vez, inhiba su degradación. Existen numerosos fijadores que pueden ser usados para experimentos de inmunohistoquímica, sin embargo algunos anticuerpos solamente reconocen su antígeno en configuración nativa y la modificación estructural producida por la fijación puede eliminar la inmunoreactividad. En este caso se debe utilizar tejido sin fijar.

Desde el punto de vista metodológico la tinción inmunohistoquímica se lleva a cabo mediante la incubación con el anticuerpo adecuado de secciones tisulares obtenidas por microtomía. Tras lavado, se procede a la detección del mencionado anticuerpo, ésta puede llevarse a cabo por métodos directos o indirectos. En el primer caso, el anticuerpo que se utiliza está conjugado con una molécula que es fácilmente detectable, normalmente la HRP aunque también puede ser una molécula fluorescente. Por su parte, el método indirecto utiliza un

anticuerpo sin marcar. Este anticuerpo, llamado "primario", tras unirse al antígeno es detectado por otro "secundario" el cual reconoce la región constante del primero y lleva unida una molécula fácilmente detectable. Así por ejemplo, si el anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal de ratón, el secundario deberá ser un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa.

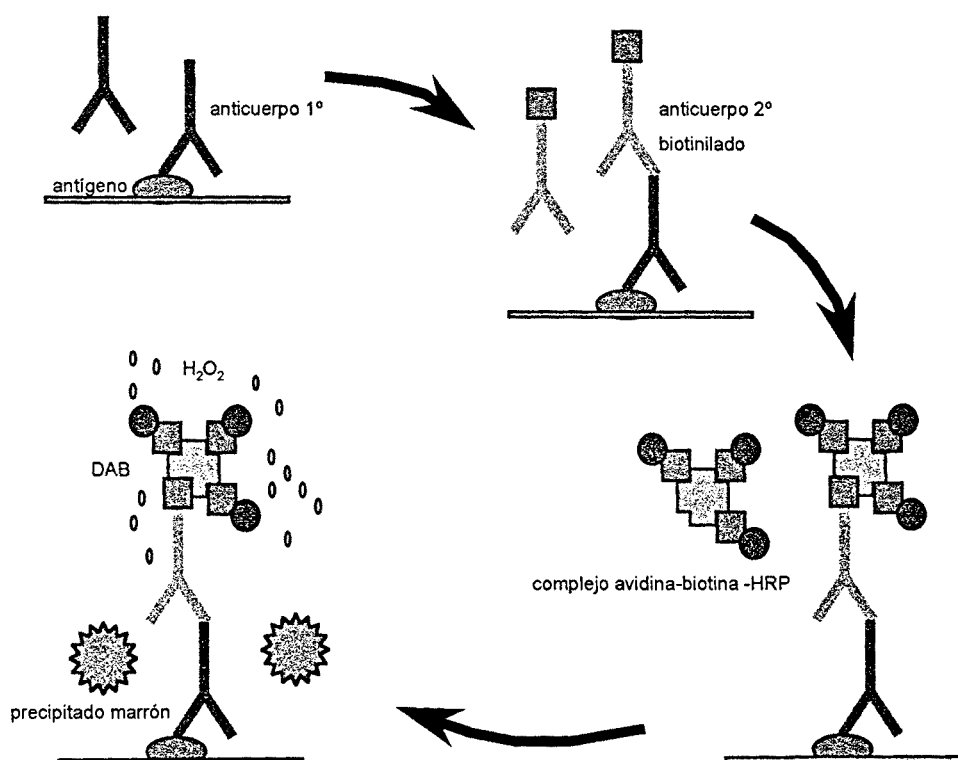


Figura 3.9: El método de la avidina-biotina. En este método el anticuerpo primario se detecta con uno secundario conjugado con biotina. La avidina y la biotina (conjugada con HRP) pueden formar un complejo altamente estable ($K_d = 10^{-15}$ M), complejo que puede unirse al anticuerpo secundario biotinilado, el cual a su vez, se había unido al anticuerpo primario. Ahora se puede usar algún método standard para visualizar el producto de la reacción catalizada por la peroxidasa. DAB, 3,3-diaminobencidina.

Método de la Avidina-Biotina

Los métodos de detección indirecta presentan sobre los de detección directa la ventaja de que la señal puede ser amplificada, mejorándola de este modo y, por ende, obteniendo una mejor observación al microscopio óptico.

El método indirecto que se usó en este trabajo fue el de la Avidina-biotina (figura 3.9). Las secciones de tejido se incuban con el anticuerpo primario, Tras lavado, el tejido es incubado con el anticuerpo secundario conjugado con biotina. Las especies para las cuales el anticuerpo secundario es dirigido deben ser

compatibles con la del anticuerpo primario. Así, si el anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal de ratón el secundario debe ser un anticuerpo anti-ratón de conejo o cabra. Ahora la biotina conjugada con HRP es incubada con la avidina ya que cada molécula de avidina es capaz de unirse a cuatro moléculas de biotina. Las secciones se incuban con el complejo formado por la avidina-biotina-HRP el cual se unirá a la biotina del anticuerpo secundario. Llegado este punto, el producto de la reacción de la HRP puede ser visualizado por métodos estándar.

El método de la avidina-biotina presenta algunas ventajas sobre otros métodos indirectos. La más evidente de ellas es la sensibilidad de la detección, la cual es claramente mayor debido a la amplificación que supone la unión de la avidina a más de una molécula de biotina conjugada. Además, actualmente existen *kits* comerciales de este método; éstos simplifican el protocolo y lo hacen más cómodo y caro.

Doble localización inmunohistoquímica

La doble tinción permite la detección simultánea de 2 antígenos diferentes en una única preparación tisular. Para realizarla, es indiferente si los anticuerpos primarios están desarrollados en la misma especie o en diferentes. En este último caso, la incubación de los anticuerpos primarios puede realizarse de forma simultánea mientras que si provienen del mismo animal, la tinción inmunohistoquímica se hace de forma secuencial. En este caso, puede incluso desarrollarse el mismo método de detección en las sucesivas tinciones, solamente es necesario cambiar el substrato de la HRP, el cual ha de generar un precipitado de color diferente en la primera tinción que en la segunda, para así poder distinguir entre ambos antígenos.

Tinción inmunohistoquímica

El día del experimento se sacaron del congelador los portaobjetos con las secciones unos 30 minutos antes de comenzar con el protocolo con tal de llevarlos a temperatura ambiente. Seguidamente se marcó el borde de los portaobjetos con una solución hidrofóbica (Dakopen) o en su defecto con una muy fina capa de silicona (Bayer). Las incubaciones de los anticuerpos se hicieron en gota,

depositando los portaobjetos en una cámara húmeda de metacrilato construida a tal efecto y cubriendo las secciones con las soluciones necesarias. La incubación para inhibir la peroxidasa endógena (en caso necesario) y los lavados se hicieron sumergiendo los portaobjetos en las soluciones necesarias contenidas en cristalizadores de 200 mL. La reacción de la peroxidasa se hizo a oscuras en cristalizadores de 100 mL. Las soluciones tampón de los lavados se prepararon el mismo día del experimento a partir de unas soluciones madre 10x preparadas con anterioridad. La solución de inmunohistoquímica se preparó el día anterior al experimento para que, de este modo, alcanzara los 4°C. Finalmente, la solución de revelado con todos los componentes necesarios para la reacción de la peroxidasa se preparó instantes antes de su utilización.

Protocolo 3.10. Tinción inmunohistoquímica de la GFAP

Si las secciones eran de tejido congelado y cortado sin fijación química, era necesario postfijar los cortes (protocolo 3.1), y luego inhibir la actividad peroxidasa del tejido cerebral mediante el procedimiento:

- 1.- Incubación con PBS 0,01 M (pH 7,4)-Metanol-H₂O₂ (0,3:9,7:90), 30 min.
- 2.- Lavado en PBS, 10 min.
- 3.- Proceder con el protocolo de tinción inmunohistoquímica a partir del paso 3.

Si las secciones eran de tejido fijado antes de ser cortado se procedía como sigue:

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Lavado en PBS 0,01 M, pH 7,4, 15 min.
- 3.- Incubación en gota a 4°C con anti-GFAP de ratón diluido 1/600 en solución de inmunohistoquímica (0,5 L de PBS; 5 mL de NGS; 0,2 g de thimerosal y 1 mL de tritón X-100), 12-16 horas.
- 4.- Continuar la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 5.- Tres lavados en PBS, 3 x 5 min.
- 6.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugada con biotina (diluida 1/250 en solución de inmunohistoquímica), 3 horas
- 7.- Tres lavados en PBS, 3 x 5 min.
- 8.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la ExtrAvidina[®] conjugada HRP (diluida 1/250 en solución de inmunohistoquímica), 2 horas
- 9.- Lavado en PBS, 5 min.
- 10.- Dos lavados en Tris-HCl (0,05 M, pH 7,6), 2 x 5 min.

- 11.- Incubación a oscuras en una solución de revelado (200 mL de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 que contiene DAB al 0,03% (p/v) y H₂O₂ al 0,006% (v/v)), 15 min.
- 12.- Lavado con agua destilada, 10-30 min.
- 13.- Deshidratación (protocolo 3.5)
- 14.- Montaje en DPX.

Protocolo 3.11. Tinción inmunohistoquímica de la colina acetiltransferasa

Todas las secciones eran de cerebro fijado por perfusión con PFA al 4%

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Lavado en TBS 0,1 M, (1,4% NaCl) pH 7,3, 15 min
- 3.- Preincubación en gota a temperatura ambiente con solución de inmunohistoquímica (28,5 mL de TBS, 1 mL de NGS, 0,04 g de thimerosal), 1 hora.
- 4.- Incubación en gota a 4°C con anti-ChAT de ratón diluido 1/500 en solución de inmunohistoquímica, 16-20 horas.
- 5.- Continuar la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 6.- Dos lavados en TBS, 2 x 10 min.
- 7.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugada con biotina (diluida 1/150 en solución de inmunohistoquímica), 3 horas
- 8.- Dos lavados en TBS, 2 x 5 min.
- 9.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la ExtrAvidina[®] conjugada HRP (diluida 1/250 en solución de inmunohistoquímica), 2 horas
- 10.- Lavado en TBS, 5 min.
- 11.- Dos lavados en Tris-HCl (0,05 M, pH 7,6), 2 x 5 min.
- 12.- Incubación a oscuras en una solución de revelado (200 mL de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 que contiene DAB al 0,03% (p/v) y H₂O₂ al 0,006% (v/v)), 15 min.
- 13.- Lavado con agua destilada, 10-30 min.
- 14.- Deshidratación (protocolo 3.5)
- 15.- Montaje en DPX.

Protocolo 3.12. Tinción inmunohistoquímica de la parvalbúmina

Todas las secciones utilizadas eran de tejido cerebral fijado por perfusión transcardíaca.

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Lavado en PBS 0,01 M, pH 7,4, 15 min.

- 3.- Incubación en gota a 4°C con anti-parvalbúmina de ratón diluido 1/1.500 en solución de inmunohistoquímica (0,5 L de PBS; 5 mL de NGS; 0,2 g de thimerosal y 1 mL de tritón X-100), 16-20 horas.
- 4.- Continuar la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 5.- Tres lavados en PBS, 3 x 5 min.
- 6.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugada con biotina (diluida 1/250 en solución de inmunohistoquímica), 3 horas
- 7.- Tres lavados en PBS, 3 x 5 min.
- 8.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la ExtrAvidina® conjugada HRP (diluida 1/250 en solución de inmunohistoquímica), 2 horas
- 9.- Lavados en PBS, 5 min.
- 10.- Dos lavados en Tris-HCl (0,05 M, pH 7,6), 2 x 5 min.
- 11.- Incubación a oscuras en una solución de (protocolo 3.7), 15 min.
- 12.- Lavado con agua destilada, 10-30 min.
- 13.- Deshidratación (protocolo 3.5)
- 14.- Montaje en DPX.

Protocolo 3.13. Tinción inmunohistoquímica de la $\gamma\gamma$ -enolasa

Todas las secciones utilizadas eran de cerebros congelados sin perfundir.

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Incubación en una solución acuosa de Lisina 0,1 M, 30 min.
- 3.- Tres lavados en PBS (0,1 M pH 7,4), 3 x 3 min.
- 4.- Incubación en la solución de inmunohistoquímica (0,5 L de PBS; 5 mL de NGS; 0,2 g de thimerosal y 1 mL de tritón X-100), 60 min.
- 5.- Incubación en gota a 4°C con anti- $\gamma\gamma$ -enolasa de conejo diluido 1/400 en solución de inmunohistoquímica, 36 horas.
- 6.- Continuar la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 7.- Tres lavados en PBS, 3 x 5 min.
- 8.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la IgG de conejo conjugada con biotina (diluida 1/250 en solución de inmunohistoquímica), 3 horas.
- 9.- Tres lavados en PBS, 3 x 5 min.
- 10.- Incubación en gota y a temperatura ambiente con la ExtrAvidina® conjugada HRP (diluida 1/250 en solución de inmunohistoquímica), 2 horas
- 11.- Lavados en PBS, 5 min.
- 12.- Dos lavados en Tris-HCl (0,05 M, pH 7,6), 2 x 5 min.
- 13.- Incubación a oscuras en una solución de revelado (protocolo 3.7), 10 min.
- 14.- Lavado con agua destilada, 10-30 min.
- 15.- Deshidratación (protocolo 3.5)
- 16.- Montaje en DPX.

AUTORRADIOGRAFIA *IN VITRO*

Fundamento de la técnica

La autorradiografía es una técnica que, en los años setenta, evolucionó de los estudios de fijación de radioligandos en homogenados tisulares y que normalmente se utiliza para el marcaje de receptores de neurotransmisores y hormonas, aunque también es útil para el marcaje de enzimas (Saura *et al.*1992, Saura1994). Cabe destacar que la visualización autorradiográfica de receptores y enzimas constituye una técnica de localización anatómica fundamentada en criterios farmacológicos. Por ello comparte con los estudios de fijación en homogenados toda una serie de requisitos, tanto relativos a las propiedades de la interacción ligando-receptor, como a las condiciones de incubación o las concernientes al análisis farmacológico de los resultados.

Desde el punto de vista metodológico la visión autorradiográfica se lleva a cabo mediante la incubación con el radioligando adecuado de secciones tisulares obtenidas por microtomía. Tras lavado y secado, las secciones se exponen a una emulsión fotográfica radiosensible cuyo revelado genera el autorradiograma, una imagen en gama de grises. Para la cuantificación se tiene en cuenta que la intensidad de gris (densidad óptica) es proporcional a la cantidad de radiactividad fijada (Pazos1996).

El procedimiento arriba descrito se conoce con el nombre de autorradiografía *in vitro*. Existe también la posibilidad de realizar la visualización autorradiográfica *in vivo*; o sea, administrando el radioligando al animal vivo y, tras sacrificarlo, obteniendo el tejido a estudiar, cortándolo y exponiéndolo a condiciones similares a las ya descritas. Sin embargo este procedimiento es poco utilizado debido a que presenta limitaciones.

Autorradiografía *in vitro*

El día del experimento se sacaron del congelador los portaobjetos con las secciones unos 30 minutos antes de comenzar con el protocolo con tal de llevarlos a temperatura ambiente. La preincubación, la incubación y los lavados se realizaron sumergiendo los portaobjetos en las soluciones necesarias contenidas en cristalizadores de 200 mL. Tras el último lavado, los portaobjetos se secaron

introduciéndolos, bajo un ventilador, en una nevera a 4°C. De esta forma se conseguía un secado rápido y en frío minimizando la difusión de radioligando.

Las soluciones tampón usadas para los lavados se prepararon el día anterior del experimento para que, de este modo, alcanzaran los 4°C. El tampón de la solución de incubación se preparó el mismo día del experimento. Así mismo, las soluciones madre con los compuestos para determinar la fijación no específica (GABA, PK-11195, etc.) se prepararon el día del experimento.

Para preparar la solución de incubación se cogió el volumen necesario de la solución con el radioligando, se evaporó con una corriente de N₂ y se disolvió el radioligando en la solución tampón.

Dado que la eficacia en el proceso de evaporación del disolvente nunca es absoluta y para tener controlado cualquier error en medidas de volumen etc., se tomaron siempre 3 muestras de 100 mL de la solución de incubación y se contó la radiactividad en viales de centelleo a fin de estimar la concentración real de radioligando.

Cuantificación.

En este punto cabe remarcar que para transformar los valores de densidad óptica en concentración de sitios de unión es necesario exponer a la emulsión muestras de tejido con cantidades de radiactividad conocidas. Dado que la relación radiactividad-densidad óptica no es lineal, es necesario contar con patrones que cubran un amplio rango de radiactividad, lo que permite construir la curva de calibración correspondiente. Actualmente existen patrones poliméricos disponibles para los diferentes isótopos. Aunque se acompañan de su correspondiente radiactividad equivalente tisular, puede ser necesario calibrar de nuevo dichos patrones con arreglo al propio tejido estudiado con el fin de obtener de forma más precisa el equivalente tisular y valorar la fiabilidad de los patrones.

Una vez se han incubado, lavado y secado en frío las secciones es posible seguir dos alternativas:

☞ El método del *wipe off*.

- Se sacan las secciones de la nevera hasta que alcancen la temperatura ambiente

- Se colocan horizontalmente y se vierte sobre ellas unas gotas de agua para humedecerlas.
- Con un papel de filtro (Whatman®GF/B Glass microfibre discs) se desprende el corte del portaobjetos.
- Se introduce el papel de filtro en un vial de centelleo donde se añaden 2 mL de Soluene®100 (Packard, Canberra) y se deja 12 horas en agitación.
- Se añaden 5 mL de líquido de centelleo (Formula 989, NEN) y se dejan 24 h a 4°C hasta el contaje de la radiactividad.

☞ Exposición de las secciones a un film.

- Se sacan las secciones de la nevera y se dejan a temperatura ambiente hasta que cualquier resto de humedad que pueda haber en el portaobjetos se seque completamente.
- Se colocan las secciones dentro de chasis herméticos (Exposure Cassettes, Kodak). Junto con las secciones, se colocan portaobjetos que contienen patrones de radiactividad (³H-microscales, Amersham).
- A oscuras se pone una película sensible a la radiación emitida por el tritio (Hyperfilm™-³H, Amersham) en contacto con las secciones, se cierra herméticamente el chasis y se guarda a 4°C en un lugar oscuro y sin vibraciones ni movimientos.
- Pasado el tiempo necesario se abre el cassette a oscuras y se revela el film:
 - * Solución reveladora (Kodak D-19), 5 min.
 - * Solución de paro (agua destilada al 1% (v/v) de ácido acético), 30 s.
 - * Solución fijadora (Tmax Fixer, Kodak), 5 min.
 - * Agua corriente, 5 min.

Este proceso trae como resultado la obtención de imágenes de las secciones en las películas de forma que aquellas estructuras donde ha habido más fijación del radioligando aparecerán más oscuras. Este film lo podemos utilizar como negativo para obtener ampliaciones en papel (información cualitativa) o podemos medir, con un analizador de imágenes, el contenido del receptor o enzima que estemos estudiando (información cuantitativa).

Protocolo 3.14. Fijación *in vitro* de [³H]PK-11195 a secciones de tejido para el marcaje del PBR

Todas las secciones utilizadas eran de cerebros congelados sin perfundir.

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Incubación a temperatura ambiente en una solución 1 nM de [³H]PK-11195 (85 Ci/mmol) en Tris-HCl 0,05 M (pH 7,7), 2 horas.
Paralelamente se incuban unas secciones en la misma solución con PK-11195 2 μ M.
- 3.- Dos lavados en Tris-HCl (0,05 M, pH 7,7) a 4°C, 2 x 5 min.
- 4.- Tres breves inmersiones de las secciones en agua destilada a 4°C.
- 5.- Secado rápido de las secciones en una nevera con un ventilador incorporado, 16 horas.
- 6.- Para la autorradiografía, exponer las secciones a un film junto con los patrones de radiactividad, 16 días.

Protocolo 3.15 Fijación *in vitro* de [³H]quinuclidinil bencilato a secciones de tejido para el marcaje de los receptores muscarínicos

Todas las secciones utilizadas eran de cerebros congelados sin perfundir

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Incubación en una solución 1 nM de [³H]QNB (43,0 Ci/mmol) en tampón fosfato 0,015 M (pH 7,4), 90 min.
Paralelamente se incuban unas secciones en la misma solución con sulfato de atropina 1 μ M.
- 3.- Lavado en tampón fosfato (0,015 M, pH 7,4) a 4°C, 5 min.
- 4.- Dos breves inmersiones de las secciones en agua destilada a 4°C.
- 5.- Secado rápido de las secciones en una nevera con un ventilador incorporado, 16 horas.
- 6.- Para la autorradiografía, exponer las secciones a un film junto con los patrones de radiactividad, 14 días.

Protocolo 3.16 Fijación *in vitro* de [³H]muscimol a secciones de tejido para el marcaje del receptor GABA_A

Todas las secciones utilizadas eran de cerebros congelados sin perfundir.

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Preincubación en una solución 2,5 mM de CaCl₂ en Tris-citrato 0,05 M (pH 7,4) a 4°C, 15 min.
- 3.- Incubación en una solución 12 nM de [³H]-muscimol (16,4 Ci/mmol) en Tris-citrato 0,05 M (con CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4) a 4°C, 30 min.
Paralelamente se incuban unas secciones en la misma solución con GABA 100 μ M.
- 4.- Lavado en Tris-citrato 0,05 M (con CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4) a 4°C, 5 min.

- 5.- Dos breves inmersiones de las secciones en agua destilada a 4°C.
- 6.- Secado rápido de las secciones en una nevera con un ventilador incorporado, 16 horas.
- 7.- Para la autorradiografía, exponer las secciones a un film junto con los patrones de radiactividad, 5 semanas

Protocolo 3.17. Fijación *in vitro* de (+)-[³H]MK-801 a secciones de tejido para el marcaje del receptor NMDA

Todas las secciones utilizadas eran de cerebros congelados sin perfundir.

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Incubación en una solución 10 nM de (+)-[³H]-MK-801 (20 Ci/mmol) en Tris-acetato 0,005 M (con Glu 10 μM y Gly 10 μM pH 7,9) a 4°C, 120 min.
Paralelamente se incuban unas secciones en la misma solución con (+)-MK-801 10 μM.
- 3.- Lavado en Tris-acetato 0,005 M (con CGS-19755 5 μM, pH 7,9) a 4°C, 150 min.
- 4.- Una breve inmersión de las secciones en agua destilada a 4°C.
- 5.- Secado rápido de las secciones en una nevera con un ventilador incorporado, 16 horas.
- 6.- Para la autorradiografía, exponer las secciones a un film junto con los patrones de radiactividad, 15 días.

Protocolo 3.18. Fijación *in vitro* de [³H]lazabemide a secciones de tejido para el marcaje de la MAO B

Todas las secciones utilizadas eran de cerebros congelados sin perfundir.

- 1.- Dejar atemperar las secciones, 30 min.
- 2.- Incubación en una solución 3,75 nM de [³H]-lazabemide (20,2 Ci/mmol) en Tris-HCl 0,05 M (con NaCl 120 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 5 mM y EGTA 0,5 mM, pH 7,4) a 22°C, 90 min.
Paralelamente se incuban unas secciones en la misma solución con L-deprenil 1 μM.
- 3.- Dos lavados rápidos en Tris-HCl 0,05 M (con NaCl 120 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 5 mM y EGTA 0,5 mM, pH 7,4) a 4°C, 2 x 1 min.
- 4.- Una breve inmersión de las secciones en agua destilada a 4°C.
- 5.- Secado rápido de las secciones en una nevera con un ventilador incorporado, 16 horas.
- 6.- Para la autorradiografía, exponer las secciones a un film junto con los patrones de radiactividad, 12 días.

ANÁLISIS CUANTITATIVOS

Todos los estudios morfométricos se realizaron tomando fotografías con una cámara digital (Nikon N 8008 S, Japón) conectada a un microscopio óptico (Zeiss Axiolab, Alemania). Las imágenes recogidas por la cámara se descargaban en un ordenador personal (PC 80486) y se analizaban con el paquete de *software* OPTIMAS® para Windows.

Cálculos morfométricos

Para calcular el tamaño de las áreas cerebrales se colocan éstos sobre una fuente de luz estable y con la cámara de fotografía digital se recogía una instantánea. A la vez, se realizaba una fotografía de un fragmento de regla de dibujo que nos daba una escala de longitud fiable. Se importaba la imagen al ordenador y, con una alta precisión, se podía dibujar los límites de la estructura a medir. En nuestro estudio las áreas de interés eran el área septal y el hipocampo dorsal. El área septal se delimitó como se había descrito previamente (Mahy *et al.* 1995): Es decir el límite dorsal se marcaba por el cuerpo caloso, el lateral por los dos ventrículos y el ventral se delimitó con una línea recta que unía la terminación de ambos ventrículos. El programa OPTIMAS calculaba el área rodeada utilizando la regla fotografiada como escala.

Área de calcificación

El área de calcificación se calculaba por discriminación de colores. Tras poner las secciones teñidas con rojo de alizarina sobre una fuente de luz estable se les tomaba una fotografía en color y se importaba en el ordenador. El programa informático seleccionaba el color rojo de la imagen que se correspondía con los depósitos de calcio teñidos con rojo de alizarina (ver protocolos) y calculaba el área ocupada utilizando, de nuevo, una regla fotografiada junto a las secciones como escala.

Autorradiografía *in vitro*

Para la cuantificación de las películas de autorradiografía *in vitro* de nuevo se colocaban éstos sobre una fuente de luz estable y con la cámara de fotografía digital se recogía una instantánea. Se importaba la imagen al ordenador y, con una

alta precisión, era posible dibujar los límites de la estructura a medir. Tras ello, el ordenador integraba los valores de densidad óptica de todos los *pixels* recogidos dentro del área dibujada por el usuario. Estos valores de densidad óptica eran entonces transformados en unidades biológicas gracias a la utilización de los patrones de radiactividad (ver arriba). Estos permitían convertir la densidad óptica en Ci/mg tejido. Como la unidad más común en estos estudios era fmol/mg prot. se habían de aplicar cuatro factores:

- a) La actividad específica del radioligando.
- b) El número de moléculas de radioligando que se une a la proteína.
- c) El contenido de proteína del tejido. En todos los casos se tomó como contenido el valor de 8%, valor que se había determinado previamente en el laboratorio.
- d) El factor de desintegración de la radiactividad de los patrones.

Así, la conversión queda:

$$\frac{\text{Ci}}{\text{mg tej.}} \times \frac{\text{nmol lig.}}{\text{Ci}} \times \frac{\text{moléc. enz.}}{\text{moléc lig.}} \times \frac{\text{mg tej.}}{\text{mg prot.}} \times \frac{1}{\text{desintegración}}$$

(a) (b) (c) (d)

Recuento neuronal

El recuento de neuronas se realizó al microscopio óptico a 100 aumentos y utilizando una rejilla en el ocular (1,25 x 1,25 mm). Se contó el número de neuronas un mínimo de tres veces en cada sección, tomando como valor la media de los tres. Como corrección del error debido al grueso de la sección sobre la que se realiza el recuento, se utilizó el método de Floderus (Floderus 1944). Este método consiste en multiplicar el valor obtenido en el recuento por una constante, la cual resulta de aplicar la fórmula $t/(t+D-2b)$; donde t es el grosor de la sección, D el diámetro medio del soma neuronal y b el tamaño más pequeño que puede ser detectado al microscopio en esas condiciones. En nuestro caso, en el recuento realizado en el complejo MS-DBB, el diámetro celular medio encontrado era de $18 \pm 3 \mu\text{m}$ y concordaba con la literatura (Kiss *et*

al. 1990a, Fischer *et al.* 1991a), mientras que el tamaño mínimo detectado era de 8 μm . Dado que el grosor de nuestros cortes era de 12 μm , el factor de corrección de Floderus ascendía a 0,86.

En el hipocampo se calculó la densidad neuronal en tres capas. Para ello, el recuento neuronal se hizo a 400 aumentos, las neuronas tenían un tamaño de $12 \pm 3 \mu\text{m}$ y el tamaño mínimo detectable era de 5 μm , por lo que el factor de Floderus ascendía a 0,8.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Dada la gran variedad de métodos estadísticos utilizados en este estudio, el análisis estadístico utilizado en el tratamiento e interpretación de los datos viene especificado en la sección de metodología específica de cada uno de los capítulos de resultados. Valga como regla general decir que los valores vienen siempre dados como media \pm error estándar de la media (SEM).

4. Resultados y discusiones

4.1

Comparación de la respuesta a la dosis de AMPA con la evolución de la lesión excitotóxica en el septo medio

4.1:

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA A LA DOSIS DE AMPA CON LA EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN EXCITOTÓXICA EN EL SEPTO MEDIO.

INTRODUCCIÓN

La vía septohipocampal es un excelente ejemplo de vía colinérgica del SNC ya que está muy bien caracterizada tanto en términos fisiológicos como anatómicos. Las neuronas localizadas en el MS y la DBB proveen a la formación hipocampal de la mayor parte de su inervación colinérgica, controlan el ritmo *theta* y están implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje (Dutar *et al.* 1995, Mizumori *et al.* 1990, Vanderwolf *et al.* 1994) Además se ha mostrado vulnerable al envejecimiento y algunos procesos neurodegenerativos (Allen *et al.* 1988, Arendt *et al.* 1985, Etienne *et al.* 1986, Markowska *et al.* 1995). Por todo ello, la creación de modelos animales para el estudio de dichos procesos se ha centrado a menudo en el estudio de esta vía, generalmente utilizando inyecciones estereotáxicas de excitotoxinas como el ácido quinolínico, el iboténico, el NMDA o el AMPA (Dunnet *et al.* 1987, Everitt *et al.* 1987, Leutgeb *et al.* 1999, Mahy *et al.* 1995, Robbins *et al.* 1989, Saura *et al.* 1995, Winn *et al.* 1991). De esta forma, las neuronas colinérgicas de la vía SH se muestran sensibles a la inyección de AMPA en el MS (McAlonan *et al.* 1995) y estudios sobre el efecto de los ácidos iboténico y quisquálico en el SM han demostrado una atrofia progresiva del área septal asociada a ésta pérdida colinérgica (Mahy *et al.* 1995)

Sin embargo la vía SH no es puramente colinérgica y contiene otros neurotransmisores. Así, entre el 10 y el 30% de las neuronas de la vía contienen GABA lo que las constituye en las neuronas no colinérgicas más abundantes del complejo MS-DBB (Khöler *et al.* 1984). Estas neuronas se localizan en el centro de la estructura (Kiss *et al.* 1990a), controlan directamente las neuronas inhibitoras hipocampales (Freund *et al.* 1988) y la inmensa mayoría, si no todas, contienen parvalbúmina (Freund 1989). La infusión intraseptal de fármacos específicos del sistema GABAérgico provoca variaciones en la transmisión sináptica colinérgica en el hipocampo (Venero *et al.* 1998) y altera la habilidad en la realización de tareas

mnemotécnicas (Chrobak *et al.* 1992), lo que indica la participación de este tipo neuronal en la regulación de las funciones colinérgicas de la vía SH. Sin embargo y a pesar de que se ven afectadas (Venero *et al.* 1998), hasta donde nosotros sabemos, hay muy pocos trabajos dirigidos a estudiar la participación de estas neuronas de la lesión excitotóxica del SM.

La reacción glial es un rasgo característico asociado al daño cerebral y diferencias locales en los mecanismos de compensación glial podrían subyacer en las diferencias regionales de vulnerabilidad a la lesión excitotóxica que se han encontrado (Mahy *et al.* 1995, Saura *et al.* 1995). Además, el proceso neurodegenerativo inducido por excitotoxinas puede llevar a la formación de depósitos de calcio en el núcleo lesionado (Korf *et al.* 1984, Mahy *et al.* 1999, Nitsch *et al.* 1990, Petegnief *et al.* 1999, Robledo *et al.* 1999). Esta calcificación cerebral parece ser que no sólo dependa de los movimientos de calcio en la célula sino también del tipo de receptor de glutamato implicado y su distribución en el área lesionada (Bernal *et al.* 2000b). Por ello se han observado variaciones regionales en la vulnerabilidad a la calcificación del SNC, siendo el MS una de las más resistentes tras la inyección de cualquier excitotoxina (Mahy *et al.* 1995, Saura *et al.* 1995). En cualquier caso parece ser que la reacción astrogliar, tradicionalmente asociada con el daño neuronal, está directamente implicada en estos procesos de calcificación cerebral (Mahy *et al.* 1999).

El objetivo de este trabajo era caracterizar la neurodegeneración presente en el MS tras la lesión excitotóxica de AMPA y la evolución a largo plazo de este proceso. Para ello se cuantificó la atrofia del área septal, la pérdida neuronal, la calcificación del área y las reacciones astro y microglial. En primer lugar se realizó un estudio de respuesta a la dosis con la microinyección de AMPA a diferentes concentraciones (entre 0,54 y 21,6 mM). Dos meses después de la lesión se midieron, la atrofia del área septal, las pérdidas colinérgica y GABAérgica, y las reacciones astro y microglial, así como el acontecimiento, localización y área de calcificación en el MS. La posible relación entre todos esos parámetros fue evaluada realizando correlaciones matemáticas. Finalmente, se intentó determinar la evolución del proceso excitotóxico realizando un estudio de los mismos parámetros a diferentes tiempos tras la lesión.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Análisis de respuesta a la dosis

Se utilizaron treinta y dos ratas divididas en ocho grupos de cuatro animales cada uno. Tras anestesia, a seis de esos grupos se les inyectó por estereotaxia 0,5 μ L de AMPA en las coordenadas correspondientes al septo medio. La concentración de la excitotoxina, diferente en cada grupo, era de 0,54; 2,7; 5,4; 10,8; 16,2 y 21,6 mM respectivamente. A un grupo se le inyectó 0,5 μ L de PBS 50 mM y el restante se utilizó como control. Las dosis de AMPA se escogieron según estudios previos (Petegnief *et al.* 1999) estando la mayor de ellas al límite de solubilidad de la toxina. Dos meses después los animales fueron anestesiados y perfundidos con una mezcla de paraformaldehído al 4% (p/v) y ácido pícrico al 0,4% (p/v). Posteriormente se les extrajo el cerebro, el cual, tras crioprotección con sacarosa al 15 % (p/v), se congeló con nieve carbónica.

Análisis de evolución de la lesión

Se utilizaron cuarenta y dos ratas divididas nueve grupos de cuatro animales cada uno y un último de seis ratas. Tras anestesia, al de seis animales y a cuatro grupos más se les inyectó por estereotaxia 0,5 μ L de AMPA 5,4 mM en las coordenadas correspondientes al septo medio. A los cinco grupos restantes se le inyectó 0,5 μ L de PBS 50 mM. Los animales fueron anestesiados y perfundidos con fijador a los 4 días, 14 días, 1 mes, 2 meses y 7 meses de ser operados por estereotaxia. Inmediatamente después se extrajo el cerebro, el cual, tras crioprotección con sacarosa al 15 % (p/v), fue congelado con nieve carbónica.

Análisis histológico

Con el criostato se obtuvieron cortes coronales seriados de 12 μ m de grosor en cuatro niveles a lo largo de todo el área septal (figura 4.1.1) de todos los cerebros, siendo las coordenadas de +0,12; +0,7 (el lugar de inyección); +0,2 y -0,25 mm de *bregma*, siempre según el atlas de Paxinos *et al.* (1986). Sobre esos cortes se realizaron las siguientes experiencias:

- ☞ Tinción de Nissl.
- ☞ Tinción contrastada de rojo de alizarina.
- ☞ Tinción inmunohistoquímica de la GFAP.

- ☞ Tinción inmunohistoquímica de la ChAT.
 - ☞ Tinción inmunohistoquímica de la parvalbúmina.
 - ☞ Tinción histoquímica de la isolectina B₄.
- En algunas secciones se realizaron dos tinciones diferentes.

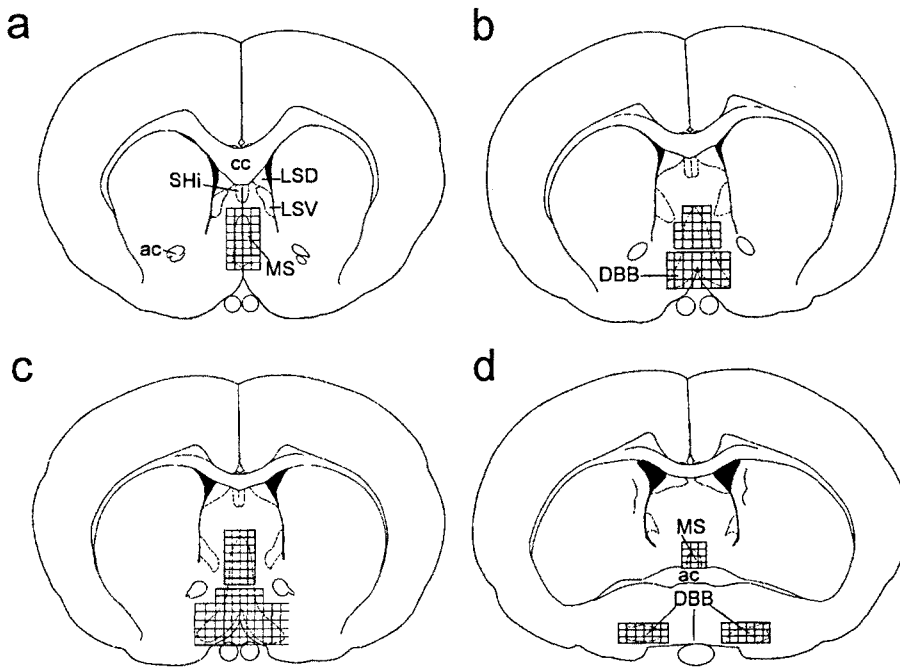


Figura 4.1.1: Dibujo esquemático de secciones coronales del cerebro de rata mostrando las cuatro zonas del complejo MS-DBB donde se hizo el estudio. Las figuras están modificadas del Atlas de Paxinos *et al.* (1986) y se corresponden con los niveles de +1,2 mm a *bregma* (a), el lugar de inyección, +0,7 mm a *bregma* (b), +0,2 mm a *bregma* (c) y -0,25 mm a *bregma* (d). Las células teñidas con la inmunohistoquímica de la ChAT o de la parvalbúmina fueron contadas dentro de las áreas marcadas. MS, septo medio; DBB, banda diagonal de Broca; LSD, septo lateral dorsal; LSV, septo lateral ventral; Shi, nudo septohipocampal; ca, comisura anterior; cc, cuerpo calloso.

Análisis cuantitativo.

Se midió el tamaño del área septal según criterios establecidos (ver *Materiales y Metodología General*) sobre secciones teñidas con violeta de cresilo a cuatro niveles diferentes de toda la extensión rostrocaudal de la región del MS-DBB (figura 4.1.1). Con tal de corregir la variabilidad producida por el tamaño cerebral de cada animal así como la debida al encogimiento cerebral fruto del tratamiento histológico, también se midió el área del núcleo estriado adyacente al septo. El área de calcificación, por su parte, se midió en los mismos niveles que el área septal y se hizo sobre secciones tratadas con la tinción contrastada del rojo de alizarina.

La muerte neuronal en el septo medio se calculó con el recuento de neuronas al microscópio óptico a 100 aumentos, según Kiss *et al* (1990a). Se contó el número de neuronas ChAT y parvalbúmina inmunopositivas, de nuevo a los cuatro niveles definidos de toda la extensión rostrocaudal (figura 4.1.1) y el factor de corrección de Floderus ascendía a 0,86 (ver *Materiales y Metodología General*).

Análisis estadístico.

En el estudio de respuesta a la dosis y tras la prueba de Mann-Witney se encontró que los resultados de las ratas a las que se inyectó vehículo y las controles no diferían en ninguno de los parámetros estudiados por lo que sus valores fueron agrupados en un único grupo control. Para cada parámetro, los valores de ese grupo se compararon con los de todas las ratas lesionadas con AMPA por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Cuando esta prueba indicó que había diferencias, se utilizó la prueba de Mann Whitney para comparar cada grupo entre sí. En el estudio de evolución de la lesión se siguió un procedimiento similar. Los resultados se expresan como media \pm SEM y el número de neuronas se expresa como porcentaje respecto al control.

RESULTADOS

Estudio de efecto de la dosis

☞ *Análisis morfométrico.* Dos meses tras la inyección de AMPA se encontró una reducción muy significativa de toda el área septal en todos los niveles estudiados y en todas las dosis de AMPA excepto en la de 0,54 mM (figuras 4.1.2 y 4.1.3). La prueba de Kruskal Wallis dio unos valores de: KW = 22,4, p = 0,001; KW = 22,2, p = 0,0012; KW = 17,7, p = 0,0069; y KW = 19,7, p = 0,0031 respectivamente para cada nivel estudiado. Esas reducciones de área aumentaban siempre con la dosis hasta la concentración de 5,4 mM, concentraciones mayores de AMPA resultaban en reducciones similares (figura 4.1.3) y alcanzaban entre el 35 y el 40% del área de los animales control. Al medir el área del núcleo estriado adyacente no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos en ninguno de los niveles estudiados (no se muestra).

☞ *Lesión colinérgica.* Se observó una pérdida significativa de neuronas colinérgicas en el MS de los cuatro niveles septales estudiados (valores de la prueba de Kruskal Wallis: KW = 23,41, $p = 0,0007$; KW = 23,06, $p = 0,0008$; KW = 25,84, $p = 0,0002$; y KW = 20,80, $p = 0,002$ respectivamente para cada nivel septal). La población de neuronas positivas para la ChAT estaba reducida dramáticamente entre un 70 y un 80% a partir de la dosis 2,7 mM de AMPA (figura 4.1.3). Esta pérdida era específica del MS puesto que la DBB sólo mostró una pérdida colinérgica en su parte superior y en el lugar de inyección (tabla 4.1.1.) Las neuronas colinérgicas de la DBB dorsal no aparecieron afectadas.

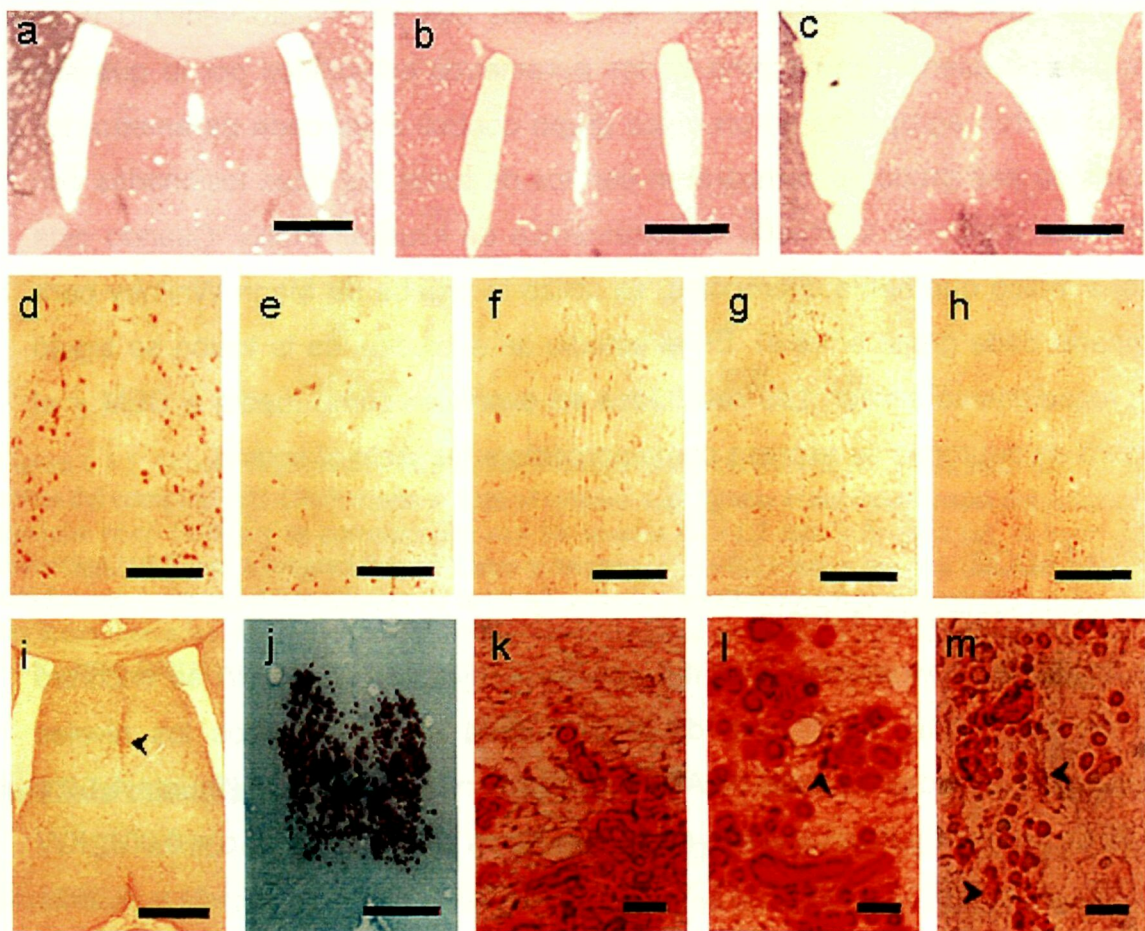


Figura 4.1.2: Estudio de respuesta a la dosis de AMPA inyectada en el septo medio. Tinción de Nissl del área septal de una rata control (a), lesionada con AMPA 2,7 mM (b) y con AMPA 16,2 mM (c). Inmunohistoquímica de la ChAT en una rata control (d) y una que recibió la infusión de AMPA 5,4 mM (e). Inmunohistoquímica de la parvalbúmina en el MS de una rata control (f), una lesionada con AMPA 5,4 mM (g) y con AMPA 16,5 mM (h). Inmunohistoquímica de la GFAP de una rata que recibió una dosis de 10,8 mM con reacción astrogliosa asociada a la cicatriz de la aguja (punta de flecha) (i). Depósitos de calcio teñidos con rojo de alizarina tras una inyección de AMPA 21,6 mM (j). No se encontraron astrocitos asociados a los depósitos de calcio (k), pero sí microcitos (punta de flecha) (l). Neuronas inmunopositivas para la parvalbúmina asociadas a depósitos de calcio (puntas de flecha) (m). Barras: (a-c) 250 μm ; (d-h) 100 μm ; (i) 200 μm ; (j) 75 μm ; (k-m) 25 μm .

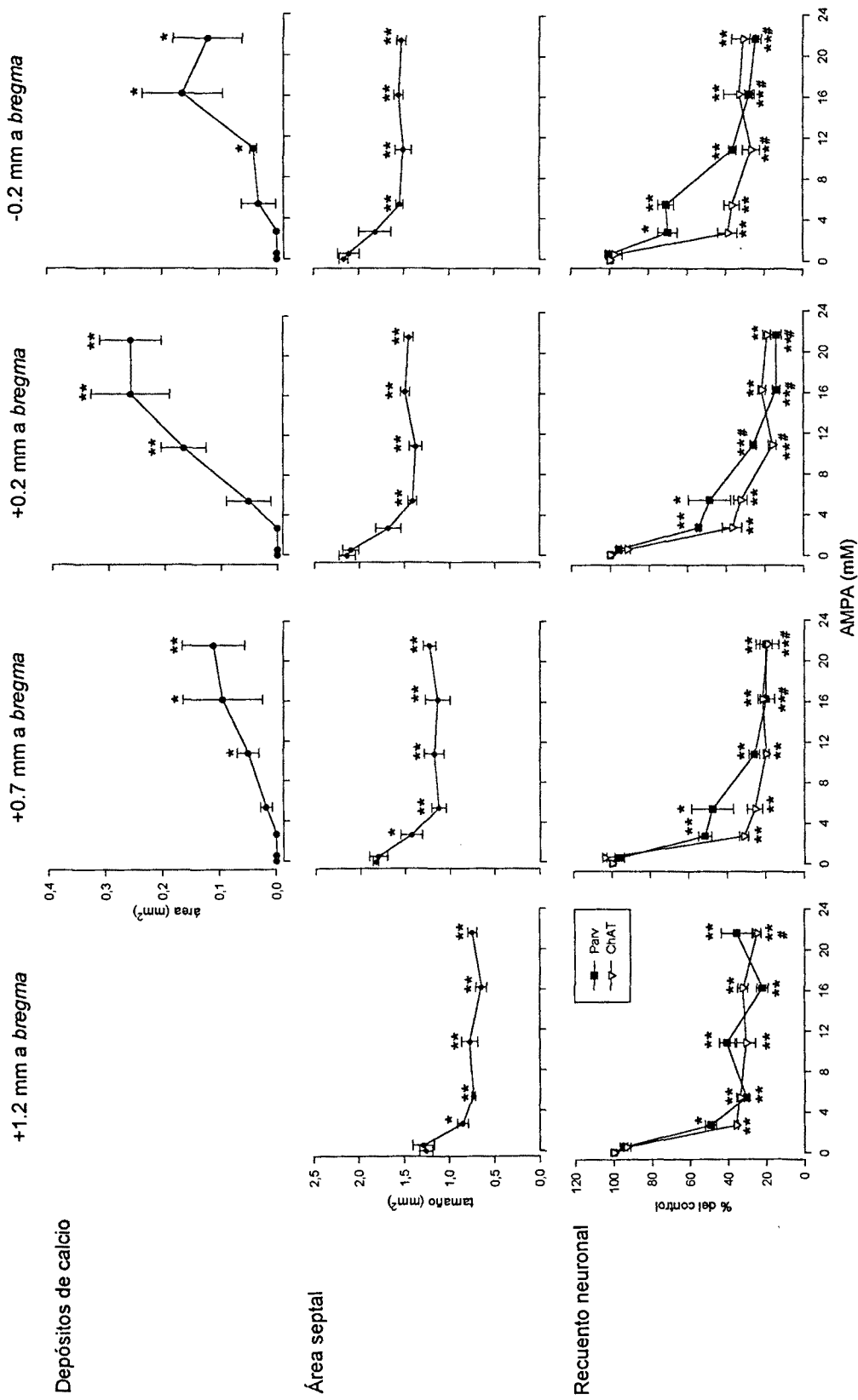


Figura 4.1.3: Representación gráfica del área de calcificación, la atrofia septal y las pérdidas neuronales colinérgica y GABAérgica del MS en función de la dosis de AMPA inyectada. Las distancias a *bregma* representan los cuatro niveles a los que se realizó el estudio. *, $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ respecto al control; #, $P < 0,05$ respecto a la dosis de 5,4 mM

4.1: Efectos del AMPA en el septo medio

La inmunoreactividad de la ChAT encontrada en las neuronas supervivientes del MS y la parte vertical de la DBB no era diferente a la aparecida en las células de la parte dorsal de la DBB de la misma sección o en animales control. Además, al medir el soma neuronal no se encontraron diferencias de tamaño entre las neuronas positivas para la ChAT supervivientes a la lesión (diámetro medio $18 \pm 2 \mu\text{m}$; $n = 40$) y las controles (diámetro medio $17 \pm 2 \mu\text{m}$; $n = 60$).

Tabla 4.1.1: Recuento neuronal en las ratas asignadas al estudio de respuesta a la dosis

Área cerebral y tipo neuronal	Dosis de AMPA						
	Control	0,54 mM	2,7 mM	5,4 mM	10,8 mM	16,2 mM	21,6 mM
<i>+1,2 mm a bregma</i>							
Parv. MS	59 ± 6	56 ± 5	29 ± 4	15 ± 3**	24 ± 4**	13 ± 4**	21 ± 7**
ChAT MS	298 ± 13	278 ± 17	107 ± 8**	99 ± 9**	91 ± 11**	96 ± 7**	74 ± 8**§
<i>+0,7 mm a bregma</i>							
Parv. MS	81 ± 6	78 ± 8	42 ± 5**	36 ± 15*	21 ± 5**	16 ± 5**§	16 ± 4**§
ChAT MS	355 ± 29	371 ± 20	112 ± 2**	91 ± 7**	70 ± 8**	77 ± 6**	82 ± 14**
<i>+0,2 mm a bregma</i>							
Parv. MS	92 ± 6	88 ± 6	50 ± 5**	41 ± 17*	24 ± 3**§	13 ± 3**§	13 ± 3**§
ChAT MS	360 ± 28	328 ± 16	133 ± 20**	118 ± 12**	69 ± 9**§	78 ± 10**	78 ± 11**
<i>-0,25 mm a bregma</i>							
Parv. MS	57 ± 6	58 ± 7	40 ± 6*	41 ± 9	21 ± 3**§	16 ± 3**§	14 ± 3**§
ChAT MS	147 ± 11	130 ± 7	52 ± 9**	49 ± 8**	36 ± 7**	44 ± 15**	41 ± 10**
<i>+0,7 mm a bregma</i>							
Parv. DBB	151 ± 9	142 ± 19	110 ± 19	112 ± 17	90 ± 12*	97 ± 16*	91 ± 11*
ChAT DBB	501 ± 16	507 ± 34	482 ± 24	467 ± 11	443 ± 4*	432 ± 24*	422 ± 19*
<i>+0,2 mm a bregma</i>							
Parv. DBB	149 ± 4	142 ± 11	131 ± 11	140 ± 12	138 ± 19	107 ± 19*	113 ± 18
ChAT DBB	499 ± 17	508 ± 14	461 ± 14	489 ± 11	458 ± 23	472 ± 22	478 ± 39
<i>-0,25 mm a bregma</i>							
Parv. DBB	87 ± 6	89 ± 13	72 ± 10	86 ± 8	78 ± 14	62 ± 13	78 ± 9
ChAT DBB	282 ± 14	276 ± 19	294 ± 19	286 ± 18	279 ± 24	273 ± 16	268 ± 12

Los valores corresponden a la media ± SEM *, $p < 0,01$; **, $p < 0,01$ respecto al control; §, $p < 0,05$ respecto a AMPA 5,4 mM; parv, parvalbúmina

☞ *Lesión GABAérgica.* Las neuronas GABAérgicas del MS se han mostrado sensibles a la lesión excitotóxica inducida por AMPA (tabla 4.1.1). Así, en los cuatro niveles estudiados las neuronas marcadas para la parvalbúmina disminuyeron entre un 55 y un 80%, dependiendo de la dosis de AMPA inyectada (KW = 24,13, p = 0,0005; KW = 23,62, p = 0,0006; KW = 24,18, p = 0,0005; y KW = 24,08, p = 0,0005 respectivamente para cada nivel septal). Sin embargo, para alcanzar la pérdida GABAérgica más severa era necesaria una mayor dosis de excitotoxina que en el caso de las neuronas inmunopositivas para la ChAT (figura 4.1.3).

Al contrario del caso anterior, La inmunoreactividad de la parvalbúmina encontrada en las neuronas supervivientes del complejo MS–DBB era más débil que la aparecida en animales control. Sin embargo, al medir el soma de las neuronas no se encontraron diferencias de tamaño entre las neuronas GABAérgicas supervivientes a la lesión (diámetro medio $19 \pm 3 \mu\text{m}$ n = 30) y las de las ratas control (diámetro medio $20 \pm 4 \mu\text{m}$; n = 40).

☞ *Depósitos de calcio.* Al contrario de estudios previos utilizando otras excitotoxinas, se encontraron depósitos de calcio tras la inyección de AMPA en el MS. Basándonos en una clasificación previa (Saura *et al.* 1995) los depósitos fueron divididos según su diámetro en *pequeños* (menos de $3 \mu\text{m}$), *medianos* (de 3 a $10 \mu\text{m}$) y *maduros* (mayores de $10 \mu\text{m}$) La mayoría de esos depósitos eran *medianos* visibles directamente al microscopio óptico sin tinción específica y mostraban a menudo un corazón oscuro. Algunos depósitos *maduros* y *pequeños* (estos últimos teñidos de rosa con la alizarina) se encontraron también cerca de algunas neuronas y células gliales. Topográficamente, los depósitos de calcio se localizaban en el centro del MS y la parte ventral de la DBB (figura 4.1.2), donde las células GABAérgicas son más abundantes, pero no se encontraban asociados a vasos sanguíneos ni a la cicatriz de la aguja. Igualmente, la mayor calcificación se encontró en el nivel correspondiente a +0,2 mm de *bregma* (figura 4.1.3) mientras que el nivel más rostral (+1,2 mm a *bregma*) no mostró calcificación.

Al cuantificar el área ocupada por los depósitos de calcio, las dosis mayores de 5,4 mM mostraron una precipitación significativa estadísticamente (KW = 16,7, p = 0,0021; KW = 17,2, p = 0,0042; y KW = 10,9, p = 0,026 para cada nivel septal). Dicha precipitación, aunque aumentaba levemente, no aparecía dependiente de la

dosis de excitotoxina inyectada (figura 4.1.2). La inyección de AMPA 5,4 mM indujo a la precipitación de calcio en la mitad de los animales (dos de cuatro), en esas ratas los depósitos se localizaban principalmente en el lugar de inyección y eran de los denominados *pequeños*. No se detectaron depósitos de calcio en ningún animal control ni en los que recibieron una dosis de AMPA inferior a 5,4 mM.

☞ *Reacción glial.* Dos meses tras la lesión, la tinción inmunohistoquímica de la GFAP no mostró al microscopio óptico ningún tipo de astrogliosis. Al compararse con los animales control, el único aumento de tinción astrogliosa encontrado en los animales operados con AMPA estaba asociado a la cicatriz de la aguja en el momento de la inyección, esta reacción también se encontró en los animales operados con vehículo. En ningún animal se apreció astrogliosis en el resto del área septal. Por su parte, la tinción histoquímica de la isolectina B₄ reveló una microgliosis en todas las ratas operadas con AMPA que presentaban calcificación del MS. Se encontraron numerosos microcitos reactivos siempre asociados con los depósitos de calcio presentes en el centro del complejo MS-DBB como quedó evidente tras el contraste con rojo de alizarina (figura 4.1.2).

Evolución de la lesión

☞ *Análisis morfométrico.* En los animales control, no se observó ninguna variación en el tamaño del área septal asociada con la edad (KW= 1,03; p = 0,64 en el lugar de inyección). Así, las ratas que recibieron la inyección de PBS y fueron matadas cuatro días después (edad total 2 meses) mostraron un tamaño del área septal igual al de las ratas que recibieron perfusión transcardíaca siete meses tras la lesión (edad total 9 meses). Por ello todos esas ratas fueron reunidas en un único grupo control. Sin embargo, en las ratas operadas con AMPA 5,4 mM se detectó una progresiva disminución del área septal en los cuatro niveles estudiados (KW = 21,9, p = 0,0005; KW = 23,3, p = 0,0003; KW = 21,4, p = 0,0007; y KW = 22,3, p = 0,0005 respectivamente). La atrofia del área fue significativa transcurridos dos meses desde la lesión, alcanzando el 35% del área control, atrofia que a los siete meses continuaba aumentando (figura 4.1.4). La reducción del área era especialmente importante en el nivel de la inyección (+0,7 mm a *bregma*) y

bastante discreta en el punto más caudal del estudio (figura 4.1.4). Nuevamente, al medir el área del núcleo estriado adyacente no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos en ninguno de los niveles estudiados (no se muestra).

☞ *Lesión colinérgica.* En los animales control, no se observó ninguna variación asociada con la edad en el número de neuronas inmunopositivas para la ChAT en el MS (KW= 0,47; p = 0,98 en el lugar de inyección) por lo sus valores fueron agrupados. La microinyección de AMPA 5,4 mM produjo una severa pérdida de neuronas colinérgicas en el MS que, cuatro días después, alcanzaba el 40% en toda la estructura (KW = 21,6, p = 0,0006; KW = 17,7, p = 0,0014; KW = 22,5, p = 0,0004; y KW = 21,17, p = 0,0008 respectivamente para cada nivel septal). Esta pérdida de neuronas inmunoreactivas para la ChAT se mantuvo en el tiempo (tabla 4.1.2), pero no de forma lineal (figura 4.1.4). De modo que transcurridos siete meses desde la lesión todavía se apreciaba un descenso, que ya alcanzaba el 85%, en el número de neuronas que expresan ChAT en el MS. La lesión colinérgica no se mostró totalmente específica del MS puesto que en el nivel de inyección se detectó una ligera pérdida de neuronas positivas para la ChAT en la parte superior de las bandas diagonales de Broca (tabla 4.1.2). En ningún caso las neuronas que sobrevivían a la lesión mostraron una pérdida de intensidad de tinción ni atrofia neuronal respecto a las de los animales control (no se muestra).

☞ *Lesión GABAérgica.* Como en el caso anterior, los animales controles no presentaron ninguna variación asociada con la edad en el número de neuronas inmunopositivas para la parvalbúmina en el complejo MS-DBB (KW= 0,51; p = 0,97 en el lugar de inyección) por lo sus valores fueron agrupados. La inyección estereotáxica de AMPA 5,4 mM en el SM produjo una pérdida significativa de neuronas GABAérgicas en los tres niveles más anteriores del estudio (KW = 15,5, p = 0,0082; KW = 18,3, p = 0,0025; KW = 21,1, p = 0,0008 respectivamente para cada nivel). La reducción encontrada en el nivel más posterior, -0,25 mm a *bregma*, no alcanzó la significación estadística (KW = 8,95, p = 0,1109). A los cuatro días de la inyección el número de neuronas que presentaban marcaje para la parvalbúmina era sensiblemente inferior a los controles (tabla 4.1.2) alcanzando el 35% en el nivel de inyección (figura 4.1.4). Esa pérdida neuronal era progresiva alcanzando

4.1: Efectos del AMPA en el septo medio

su máximo a los sesenta días de la inyección ya que a los siete meses continuaba sólo en el lugar de inyección (+0,7 mm a *bregma*).

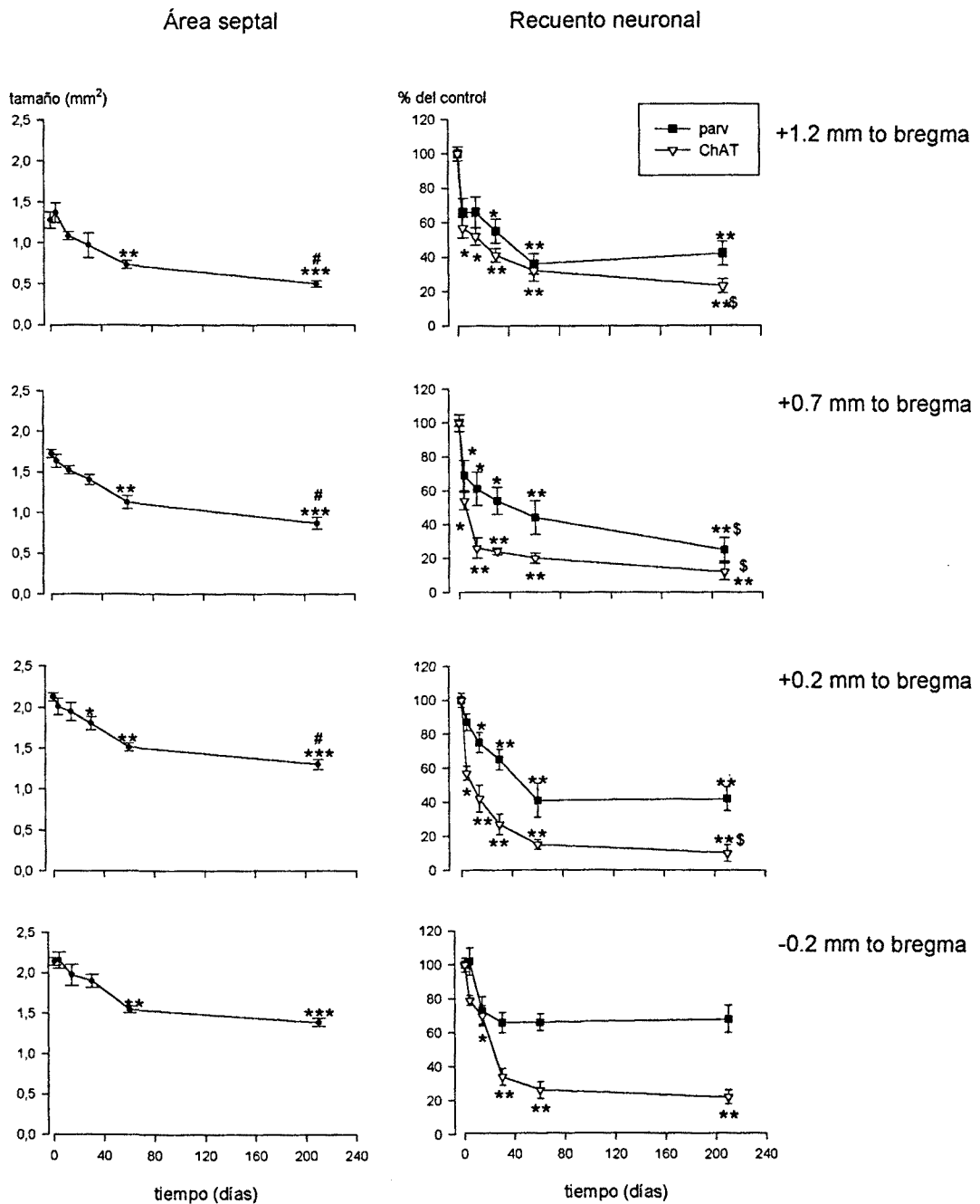


Figura 4.1.4: Representación gráfica de la atrofia septal y las la pérdidas neuronales colinérgica y GABAérgica del MS en función a lo largo del tiempo tras una inyección de AMPA 5,4 mM. Las distancias a bregma representan los cuatro niveles a los que se realizó el estudio. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$; ***, $p < 0,0001$ respecto al control; #, $P < 0,05$ respecto al tiempo de 60 días-, \$, $p < 0,05$ respecto al tiempo de 30 días.

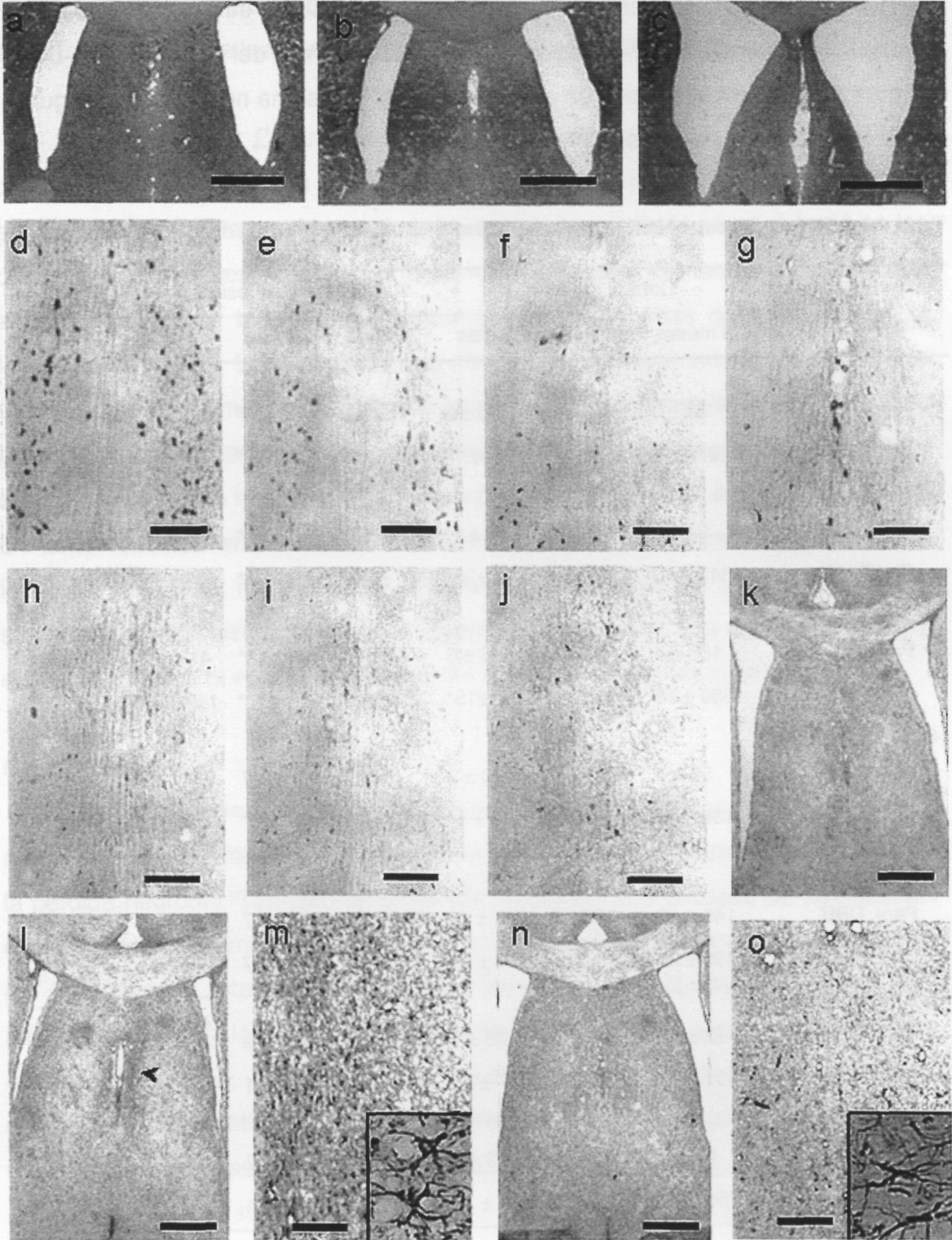


Figura 4.1.5: Estudio de evolución de la lesión en el septo medio. Tinción de Nissl del área septal de una rata control (a), 15 días (b) y 7 meses tras la lesión. Inmunohistoquímica de la ChAT en una rata control (d) cuatro días (e) sesenta días (f) y siete meses tras la lesión (g). Inmunohistoquímica de la parvalbumina en una rata control (h) quince días (i) y siete meses tras la lesión. Inmunohistoquímica de la GFAP de una rata control (k). (l) Quince días tras la lesión había reacción astrogliosa. (punta de flecha) (m) área de astrogliosis con detalle de astrocitos reactivos (aumentado 4 veces). (n,o) treinta días tras la lesión, ya no se detectó astrogliosis (recuadro aumentado 4 veces). Barras: (a-c) 250 μm , (d-j) 75 μm , (k,l,n) 150 μm , (m,o) 75 μm

4.1: Efectos del AMPA en el septo medio

Como ocurría en el estudio de respuesta a la dosis, la inmunoreactividad de la parvalbúmina encontrada en las neuronas supervivientes del complejo MS–DBB era más débil que la aparecida en animales control y el soma no mostraba ninguna atrofia neuronal (no se muestra).

Tabla 4.1.2: Recuento neuronal en las ratas asignadas al estudio de evolución de la lesión

Área cerebral y tipo neuronal	Control		Tiempo de lesión				
	3 meses	9 meses	4 días	14 días	30 días	60 días	7 meses
<i>+1,2 mm a bregma</i>							
Parv. MS	55 ± 6	53 ± 8	35 ± 8	32 ± 7	25 ± 4*	15 ± 3**	17 ± 4**
ChAT MS	270 ± 8	263 ± 15	162 ± 7*	148 ± 4*	116 ± 12**	99 ± 9**	44 ± 9**§
<i>+0,7 mm a bregma</i>							
Parv. MS	84 ± 5	85 ± 8	56 ± 8*	50 ± 6*	43 ± 9**	36 ± 15*	22 ± 3**
ChAT MS	347 ± 18	387 ± 30	223 ± 20*	107 ± 11**	99 ± 7**	91 ± 7**	47 ± 8**§
<i>+0,2 mm a bregma</i>							
Parv. MS	103 ± 4	97 ± 4	86 ± 6	74 ± 7*	53 ± 5**	41 ± 17*	40 ± 8**
ChAT MS	389 ± 15	415 ± 31	214 ± 15*	158 ± 31**	138 ± 7**	118 ± 12**	43 ± 9**§
<i>-0,25 mm a bregma</i>							
Parv. MS	55 ± 4	59 ± 6	56 ± 3	50 ± 7	53 ± 7	41 ± 9	38 ± 6
ChAT MS	138 ± 10	146 ± 9	115 ± 5*	107 ± 9*	69 ± 8**	49 ± 8**	32 ± 6**
<i>+0,7 mm a bregma</i>							
Parv. DBB	146 ± 19	153 ± 8	148 ± 11	110 ± 13	119 ± 17	112 ± 17	96 ± 10*
ChAT DBB	496 ± 24	463 ± 15	513 ± 26	454 ± 26	461 ± 17	467 ± 11	426 ± 14*
<i>+0,2 mm a bregma</i>							
Parv. DBB	152 ± 10	148 ± 12	138 ± 4	136 ± 8	143 ± 9	140 ± 12	134 ± 10
ChAT DBB	501 ± 19	486 ± 20	497 ± 25	471 ± 22	472 ± 21	489 ± 11	467 ± 17
<i>-0,25 mm a bregma</i>							
Parv. DBB	83 ± 6	97 ± 14	79 ± 8	72 ± 8	82 ± 7	86 ± 8	74 ± 7
ChAT DBB	266 ± 12	254 ± 16	281 ± 29	294 ± 16	266 ± 14	286 ± 18	286 ± 9

Los valores corresponden a la media ± SEM *, p < 0,01; **, p < 0,01 respecto al control; §, p < 0,05 respecto al grupo de 30 días; parv, parvalbúmina

☞ *Depósitos de calcio.* Tras la tinción del rojo de alizarina, no se observó calcificación en el MS de los animales control. Igualmente la dosis de 5,4 mM de

AMPA no indujo a la aparición de depósitos de calcio en el MS, ni el resto del área septal, en ninguna de las ratas asignadas a esta parte del estudio.

☞ *Reacción glial.* Cuatro días tras la inyección de vehículo y mediante la tinción inmunohistoquímica de la GFAP se observó una pequeña área de astrogliosis localizada en el lugar de la inyección. Este efecto no se detectó en los otros niveles septales ni tampoco a tiempos mayores. Se encontró una fuerte astrogliosis en casi toda el área septal de todas las ratas cuatro días tras la inyección de AMPA. Los astrocitos que mostraban la mayor inmunoreacción de la GFAP y una típica morfología reactiva con hipertrofia e hiperplasia se localizaban en el centro de la estructura, concretamente el MS y la parte superior de la DBB y abarcaban casi toda la extensión rostrocaudal del núcleo. Esta astrogliosis, aunque un tanto reducida en extensión e intensidad, se mantenía catorce días tras la inyección de AMPA, mientras que ya no era detectable tras un mes de lesión. Por su parte, la tinción histoquímica de la isolectina B₄ no reveló una reacción microglial en ningún animal, ni en las ratas operadas con AMPA ni en las controles.

Correlaciones

Se realizaron estudios de correlación entre todos los parámetros morfométricos. La intención era estimar la posible relación entre la atrofia tisular y la pérdida neuronal. También se pretendía investigar si el proceso de calcificación evolucionaba de forma paralela a algún tipo de pérdida neuronal o a los cambios del área septal. La tabla 4.1.3 ilustra los resultados encontrados al nivel de +0,2 mm a *bregma*, en los otros niveles los resultados fueron similares. En los dos estudios realizados, el recuento de neuronas inmunopositivas para la ChAT correlaciona significativamente con la atrofia del área septal y lo hace mejor que el recuento de neuronas positivas para la parvalbúmina. Además, los coeficientes de determinación eran superiores en el estudio de respuesta a la dosis que en el de evolución de la lesión. La mejor correlación se encontró al comparar los recuentos de los dos tipos neuronales entre sí. Aunque significativas, el área de calcificación presentaba unas pobres correlaciones con el resto de variables incluidas en el estudio.

Tabla 4.1.3: Coeficientes de determinación y significaciones estadísticas en los análisis de regresión lineal en el septo medio

	Área septal	Recuento ChAT	Recuento parv
Respuesta a la dosis			
Area septal			
Recuento ChAT	$r^2 = 0,66; p < 0,0001$		
Recuento parv	$r^2 = 0,55; p < 0,0005$	$r^2 = 0,82; p < 0,00001$	
Área calcio	$r^2 = 0,31; p < 0,005$	$r^2 = 0,40; p < 0,005$	$r^2 = 0,48; p < 0,001$
Evolución de la lesión			
Area septal			
Recuento ChAT	$r^2 = 0,60; p < 0,0001$		
Recuento parv	$r^2 = 0,51; p < 0,0005$	$r^2 = 0,61; p < 0,0001$	

Los resultados pertenecen al nivel de +0,2 mm a *bregma*; parv, parvalbúmina

DISCUSIÓN

El resultado más notable de este estudio muestra que la lesión excitotóxica inducida por AMPA en el MS provoca una neurodegeneración caracterizada por una atrofia del área septal y una pérdida progresiva de neuronas colinérgicas a lo largo de siete meses. Las neuronas GABAérgicas se muestran menos sensibles al proceso neurodegenerativo necesitándose alta dosis de AMPA para inducir una pérdida similar a la que presentan las neuronas colinérgicas. Además, la evolución del proceso es diferente del daño acontecido al inyectar altas dosis de la excitotoxina pues, en este último caso, la neurodegeneración se asocia a procesos de calcificación.

Resalta el hecho de que los efectos de la lesión excitotóxica inducida por AMPA en el MS incrementen con el tiempo como lo demuestran la creciente pérdida colinérgica y la persistente atrofia de área septal. Nuestros resultados reproducen los efectos de los ácidos quisquálico e iboténico, los cuales provocan una atrofia progresiva del área, seguramente debida a una pérdida neuronal (Mahy *et al.* 1995, Leutgeb *et al.* 1999). Nuestro estudio de correlaciones también indica que la pérdida neuronal en el MS sería una de las causantes de la atrofia. Sin embargo, la organización anatómica y la composición neuronal no son

homogéneas en toda la extensión del MS (Kiss *et al.* 1990a) mientras que la atrofia observada presenta unos valores similares a lo largo de toda la estructura, por lo que otros factores, como la falta de reacción astrogliar y una difusión de la excitotoxina hasta los núcleos colindantes, podrían contribuir a esta atrofia tisular. Seguramente en nuestro modelo la inyección de AMPA sea excitotóxica también en el septo lateral, como apunta la reacción astrogliar allí encontrada y como se ha observado con la inyección de ácido Iboténico (Stewart *et al.* 1987). En ese núcleo, el proceso neurotóxico puede ser también progresivo y contribuir a la atrofia del área septal. Además, la densidad de receptores de glutamato es mayor en el septo lateral que en el medio (Olsen *et al.* 1987, Le Jeune *et al.* 1996) por lo que sería más susceptible de sufrir la lesión excitotóxica.

Un estudio ultraestructural, que evaluaba la lesión excitotóxica inducida en el MS por los ácidos quinolínico y kaínico en términos de anormalidades somatodendríticas y picnosis nuclear mostró que estos síntomas desaparecían transcurridos catorce días desde la lesión (Ginsberg *et al.* 1999). Esos resultados son consecuentes con la reacción astrogliar aquí encontrada, la cual desaparece transcurrido el mismo tiempo, y podrían indicar el momento en que los mecanismos de compensación son capaces de frenar el proceso excitotóxico inducido por el AMPA, al menos en lo que se refiere a las células GABAérgicas cuyo número acaba estabilizándose en el tiempo. Sin embargo, la persistente pérdida colinérgica observada demuestra una acción selectiva de estos procesos de compensación. Dado que las células colinérgicas de la vía SH reciben una substancial cobertura glial similar a la del resto de neuronas de la estructura (Milner *et al.* 1995) podría interpretarse que la plasticidad neuronal colinérgica del SM es menos eficaz que la GABAérgica. En efecto, las células GABAérgicas del MS sobreviven en mayor proporción a la lesión excitotóxica y sólo alcanzan niveles de degeneración similares a los presentados por las células colinérgicas cuando se inyectan altas dosis de AMPA. Por otro lado, las neuronas GABAérgicas del MS contienen parvalbúmina, un recurso para la fijación del calcio que no está presente en las células colinérgicas (Freund 1989) y que les podría proporcionar una mejor adaptación al incremento de la $[Ca^{2+}]$; asociado al daño excitotóxico (Mattson *et al.* 1996).

Pero además, las neuronas colinérgicas se muestran muy dependientes del soporte glial. Así, tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral y el septo medio, las neurotrofinas han mostrado una actividad supresora del incremento tóxico en la $[Ca^{2+}]_i$ que está asociada al daño excitotóxico (Mattson *et al.* 1996). Ya es clásico el estudio en la rata donde las lesiones de la fimbria producían una degeneración de las neuronas colinérgicas en el MS, siendo estas neuronas capaces de resistir la lesión si previamente se inyectaba NGF en los ventrículos (Gage *et al.* 1988 y ver comentarios en Shooter 1992). Los astrocitos sintetizan NGF y los receptores de este factor de crecimiento en las neuronas colinérgicas de la vía SH se localizan en aposición directa a las membranas de los astrocitos colindantes en clara comunicación con este tipo celular (Martínez Murillo *et al.* 1991). En consecuencia, el mantenimiento de la función colinérgica tras una lesión en la base del cerebro anterior parece depender en gran medida del aporte de neurotrofinas por parte de la glia. Sin embargo, la severa pérdida colinérgica enfatiza la poca la producción astrocitaria de NGF y otras neurotrofinas (Shooter 1995), y es que los astrocitos también tienen receptores del glutamato (Ozawa *et al.* 1998) y pueden ser afectados por la lesión excitotóxica (Bridges *et al.* 1992) lo que condicionaría a su función neuroprotectora. En estas condiciones podrían incluso llegar a potenciar la neurodegeneración mediante la liberación tóxica de EAA y el aumento del estrés oxidativo (Tacconi 1998).

En el MS, el proceso degenerativo asociado a la microinyección de ácido iboténico y de quisculíco se caracteriza por una atrofia del área septal sin calcificación (Mahy *et al.* 1995, Waite *et al.* 1994) mientras que en condiciones similares ensayadas en este trabajo, el AMPA ha inducido a la aparición de depósitos de calcio. Nuestros resultados indican que el proceso parece depender de la intensidad del daño inicial creado por la toxina y no del tiempo postlesión. Cabe decir que el AMPA inyectado en la base del cerebro anterior provoca una lesión excitotóxica más potente que el iboténico o el quisculíco (Waite *et al.* 1994). Pero además, la sensibilidad a la infusión de AMPA es diferente entre las áreas cerebrales. Por ejemplo, en contraste con la limitada calcificación que presenta el SM aún tras dosis elevadas de AMPA, dos estudios de respuesta a la dosis iguales a éste en el globo pálido y el hipocampo demostraron una alta calcificación a partir de la dosis de 2,7 mM (Bernal *et al.* 2000c, Petegnief *et al.* 1999). Un factor a tener

en cuenta en estas diferencias regionales y entre toxinas es nuevamente la glia la cual, en función de sus propiedades intrínsecas diferentes en cada área, puede no mostrarse reactiva frente a determinados estímulos (Höke *et al.* 1994). A pesar de la intensidad de la lesión y del importante papel que juegan los astrocitos en la transmisión glutamatérgica (Hertz *et al.* 1999, Magistretti *et al.* 1999) y en los mecanismos de compensación activados durante la excitotoxicidad (Dusart *et al.* 1991, Mattson *et al.* 1996, Parpura *et al.* 1994), en el MS no hemos encontrado astroglia reactiva asociada a la calcificación como sí ha ocurrido en otros trabajos (Bernal *et al.* 2000b, Nitsch *et al.* 1990, Petegnief *et al.* 1999, Saura *et al.* 1995). Esto tiene importancia desde el momento en que, en el globo pálido de la rata, las células astrogliales están directamente involucradas en la calcificación asociada con la lesión excitotóxica (Mahy *et al.* 1999), por lo que parece ser que la precipitación del calcio en el MS tras la inyección de AMPA tenga un origen predominantemente neuronal con una minoritaria participación de la astroglia en el proceso. Por otro lado, la reacción microglial asociada a esos depósitos (Bernal *et al.* 2000b, Mahy *et al.* 1999, Petegnief *et al.* 1999, Saura *et al.* 1995) se achaca a la reacción inmunitaria y de limpieza del espacio extracelular (Barron 1995, Streit *et al.* 1999).

La localización de los depósitos aquí encontrados está restringida a las zonas del MS donde las células GABAérgicas son más abundantes por lo que, como ya se ha propuesto (Mahy *et al.* 1995), podrían ser estas células las que presentan una mayor participación en el proceso de calcificación, al menos en el MS. Avalan esta hipótesis tres hechos: (1) Son necesarias altas dosis de AMPA para que haya calcificación del MS, a la vez que para conseguir una pérdida GABAérgica máxima; mientras que la lesión colinérgica severa aparece a dosis mucho más bajas. (2) En el estudio de evolución de la lesión, a tiempos largos, no hay depósitos de calcio y las neuronas GABAérgicas se mantienen en número, mientras que las colinérgicas siguen desapareciendo. Y (3) en los estudios de correlación, el recuento GABAérgico es el parámetro que presenta una mejor regresión con el área de calcificación. Sea como fuere, el tipo neuronal implicado en la calcificación de cada núcleo nervioso tras una lesión excitotóxica puede ser diferente. Las diferencias fenotípicas en los sistemas de tamponamiento y eliminación del Ca^{2+} citoplasmático que regulan el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las

necesidades energéticas específicas y la composición y distribución de los subtipos de receptor de glutamato en cada neurona, deberían poder explicar esas diferencias.

Finalmente, el AMPA se ha mostrado como una excitotoxina más efectiva que los ácidos iboténico y quisquálico en las lesiones de los núcleos de la base del cerebro anterior a la vez que se sugería como la más específica para provocar la lesión colinérgica (Waite *et al.* 1994). Esto se corresponde con la especificidad de lesión a largo plazo aquí observada tras la inyección de una dosis baja de AMPA y con lo observado durante el envejecimiento en ratas. En estos núcleos y durante el proceso de envejecimiento se ha descrito una pérdida de neuronas colinérgicas (Fischer *et al.* 1991a) pero no de la función GABAérgica (Smith *et al.* 1995); pérdida colinérgica que, además, no se corresponde con una proporcional astrogliosis (Smith *et al.* 1995). Sin embargo como se demuestra aquí, la lesión excitotóxica del MS no es puramente colinérgica; curiosamente, los déficits cognoscitivos presentes en estos animales (Leutgeb *et al.* 1999, McAlonan *et al.* 1995) suelen corresponderse con los déficits asociados a la edad en las funciones cognoscitivas controladas por el hipocampo (Fischer *et al.* 1991a, Gallager *et al.* 1993). Por ello, sería interesante abundar más, no sólo en la contribución de las neuronas GABAérgicas del SM a los procesos cognoscitivos controlados por el hipocampo (Stewart *et al.* 1987), sino también en el papel de estas neuronas en los déficits que aparecen durante del envejecimiento.

En conclusión, la inyección de 0,5 μ L de AMPA 5,4 mM provoca un proceso neurodegenerativo caracterizado por una dramática pérdida de neuronas colinérgicas que se mantiene en progresión durante siete meses y por la persistente atrofia del área septal, significativa a partir de los dos meses de la inyección. Estos efectos parecen estar vinculados a una falta de reactividad astrogliar. Por su parte, las neuronas GABAérgicas se muestran más resistentes a la lesión excitotóxica necesitándose la inyección de dosis mayores de AMPA para alcanzar los niveles de pérdida presentados por las células colinérgicas. Además, al aumentar la dosis el proceso excitotóxico provoca la aparición de depósitos de calcio asociados a una reacción microglial.