

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

4.2

Relación entre la calcificación cerebral y la vulnerabilidad humana a la hipoxia-isquemia en el periodo perinatal



4.2:

RELACIÓN ENTRE LA CALCIFICACIÓN CEREBRAL Y LA VULNERABILIDAD HUMANA A LA HIPOXIA-ISQUEMIA EN EL PERIODO PERINATAL

INTRODUCCIÓN

Está aceptado que el cerebro de los mamíferos neonatos es más resistente a la hipoxia-isquemia que el SNC de los adultos (Cherubini *et al.* 1989, Haddad *et al.* 1990, Jilek 1970). Durante el periodo perinatal, el nivel regional de desarrollo estructural y bioquímico del SNC aparece como un factor crítico para determinar la distribución del daño hipóxico-isquémico (Azzareli *et al.* 1996, Hee Han *et al.* 2000). De esta forma, las lesiones en el SNC tras la falta de oxígeno y nutrientes difieren entre neonatos prematuros y a término. En el primer grupo el daño implica principalmente hemorragia en la matriz germinal subependimal, leucomalacia periventricular y necrosis pontosubicular (Rorke 1982), mientras que el segundo grupo presenta la necrosis de la corteza cerebral como la lesión más frecuente (Volpe 1995).

A pesar de la complejidad de los mecanismos por los que mueren las células afectadas de hipoxia-isquemia, el desorden en la homeostasis intracelular del calcio es considerado, junto con la acidosis inducida por lactato, como uno de los factores fisiopatológicos subyacentes (Longo 1997). Se sabe que las neuronas isquémicas acumulan cantidades anormales de calcio antes de degenerar y que los niveles extracelulares de calcio disminuyen durante la isquemia, presumiblemente debido al flujo del mencionado ion al interior de las células dañadas (Nicholson *et al.* 1977, Uematsu *et al.* 1988, Uematsu *et al.* 1989).

Por otro lado, la calcificación cerebral en humanos, especialmente en los ganglios de la base, la corteza cerebral y el hipocampo, ha sido asociada con numerosas situaciones patológicas incluyendo la hipoxia-isquemia (Ansar *et al.* 1990, Ellie *et al.* 1989, Harrington *et al.* 1981, Kobari *et al.* 1997, Nagaratnam *et al.* 1998, Toti *et al.* 1996). Al ser el daño asociado a una falta de aporte de oxígeno y nutrientes una causa mayor de secuelas neurológicas, el objetivo de este capítulo fue investigar la relación entre las diferencias en la vulnerabilidad humana a la

hipoxia-isquemia durante el periodo perinatal y la calcificación cerebral. Para ello se caracterizó, en términos de muerte neuronal, formación, distribución y tamaño de depósitos de calcio y reacciones astro y microglial, el daño hipóxico-isquémico en muestras de ganglios de la base, corteza cerebral e hipocampo de tejido *postmortem* de neonatos prematuros y a término.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Para estos experimentos se obtuvieron muestras de los ganglios de la base, corteza cerebral e hipocampo de cerebro humano, gracias a la colaboración de la Dra. V. Cusí del *Servei d'Anatomia Patològica* del hospital *Sant Joan de Deu* de Barcelona. Como se muestra en la tabla 4.2.1, los tejidos provenían de ocho autopsias de fetos y neonatos con claros indicios clínicos de sufrimiento cerebral hipóxico-isquémico y fueron divididas en dos grupos: tres casos de prematuros (entre 24 y 26 semanas de gestación y un tiempo tras el daño hipóxico-isquémico entre 2,5 y 30 días) y cinco a término (más 37 semanas de gestación y entre 3 días y 3 años de tiempo tras el daño hipóxico-isquémico). Se incluyeron siete casos de individuos sin indicios clínicos o histopatológicos de enfermedad o daño neurológicos (tabla 4.2.1).

Las muestras se fijaron con PFA al 4%, se deshidrataron con etanol, lavaron con tolueno e incluyeron en parafina. Posteriormente se hicieron cortes seriados con un micrótopo los cuales fueron recogidos en portaobjetos gelatinizados. Sobre esos portaobjetos se realizaron las siguientes tinciones:

- ☞ Tinción de Nissl.
- ☞ Tinción contrastada de rojo de alizarina.
- ☞ Tinción histoquímica de la Isolectina B₄ contrastada con hematoxilina.
- ☞ Tinción inmunohistoquímica de la GFAP contrastada con hematoxilina.

Análisis estadístico.

En cada grupo, se escogieron dos secciones representativas de cortes teñidos con rojo de alizarina de las tres áreas cerebrales y se les tomó una diapositiva bajo el microscopio óptico (x100) incluyendo una escala. Se proyectaron las diapositivas y se midió el diámetro (D) de cada depósito de calcio que se observara aislado o bien delimitado. La función de distribución de los diámetros de

los depósitos se examinó con la prueba de bondad de ajuste de la ji-cuadrado. Las distribuciones fueron comparadas entre ellas con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras. En ambos casos, el valor de 0,1 se escogió como la probabilidad mínima de la prueba que permitía considerar un ajuste entre distribuciones.

Por otro lado, en cada diapositiva se anotó el número (n) de depósitos medidos expresado como la media \pm SEM. En cada zona escogida como representativa se calculó el área de calcificación mediante la fórmula: $\text{área} = n \cdot \pi D^2 / 4$.

Tabla 4.2.1: Datos clínicos de los casos incluidos en el estudio

Caso	Nacimiento	Tiempo tras el daño	Hallazgos clínicos y diagnóstico
1	24 s. g.	2,5 días	850 g peso. Membrana hialina, hemorragia intraventricular.
2	26 s. g.	30 días	Cardiopatía congénita, sepsis.
3	26 s. g.	5 días	720 g peso. Membrana hialina, sepsis.
4	A término	120 días	S. Down. Cardiopatía congénita con hipertensión pulmonar, reciente necrosis neuronal.
5	A término	3 años	Cardiopatía congénita, atresia pulmonar con paro cardíaco.
6	A término	3 días	4.100 g peso. Aspiración de meconio. Broncopneumonia.
7	A término	18 días	3.700 g peso. Cardiopatía congénita.
8	A término	60 días	3.800 g peso. Cardiopatía congénita.
9	30 s. g.	Control	1.200 g peso. Abruption placentar con muerte fetal.
10	21 s. g.	Control	385 g peso. Malformación congénita (S. Patau)
11	23 s. g.	Control	630 g peso. Corioamnionitis, pneumonía perinatal, muerte neonatal temprana.
12	22 s. g.	Control	566 g peso. Pneumonía perinatal
13	A término	Control	3.135 g peso. Estenosis aórtica, fallo cardíaco que le llevó a la muerte.
14	A término	Control	3.710 g peso. Cardiopatía congénita (atresia pulmonar).
15	A término	Control	5.000 g peso. Cardiopatía congénita operada. (Transposición de grandes arterias).

Clave: S, síndrome; s. g, semanas de gestación

RESULTADOS

Estudio histopatológico

En todas las áreas afectadas de hipoxia-isquemia se observaron típicas células picnóticas y áreas de vacuolación. Las principales zonas afectadas fueron la sustancia blanca, la corteza cerebral, el putamen, el tálamo, el área periventricular correspondiente a la eminencia germinal (y el surco talámico-caudado), los alrededores de la capa CA1 del hipocampo y el giro dentado (figuras 4.2.1a, 1e y 1i). En todas ellas se detectaron zonas de necrosis y reacción glial.

En el grupo de prematuros se observó hemorragia intraventricular asociada con leucomalacia periventricular, mientras que en el grupo a término no aparecían ni hemorragia ni infarto cerebral. En éste último se observaba necrosis cortical, la cual era especialmente severa en las capas III, V y VI. También se encontró pérdida neuronal en los ganglios de la base.

Ninguna muestra control presentaba un daño específico.

Depósitos de calcio.

Ninguno de los cerebros control presentaba calcificación. Sin embargo en los dos grupos afectados por hipoxia-isquemia, la tinción del rojo de alizarina mostró depósitos de calcio en las tres áreas estudiadas, depósitos que eran más abundantes en el tálamo y el putamen. Siguiendo estudios previos (Saura *et al.* 1995), los depósitos fueron clasificados en dos categorías (medianos y pequeños). Los depósitos medianos (diámetro > 3 μm) estaban aislados o en pequeños grupos (4-10 unidades por sección) mostrando a menudo un núcleo oscuro. Los depósitos pequeños (de 1 a 3 μm) se teñían de rosa pálido, nunca presentaban un núcleo oscuro y casi siempre formaban colonias que se extendían según dos patrones diferentes: Agregados pequeños, esféricos y compactos alrededor de depósitos medianos, recreando un proceso de acreción (figura 4.2.1k). Y grandes colonias cubriendo una extensa área, a menudo rodeando una zona cerebral afectada por hipoxia-isquemia o algunas neuronas dañadas (figura 4.2.1g).

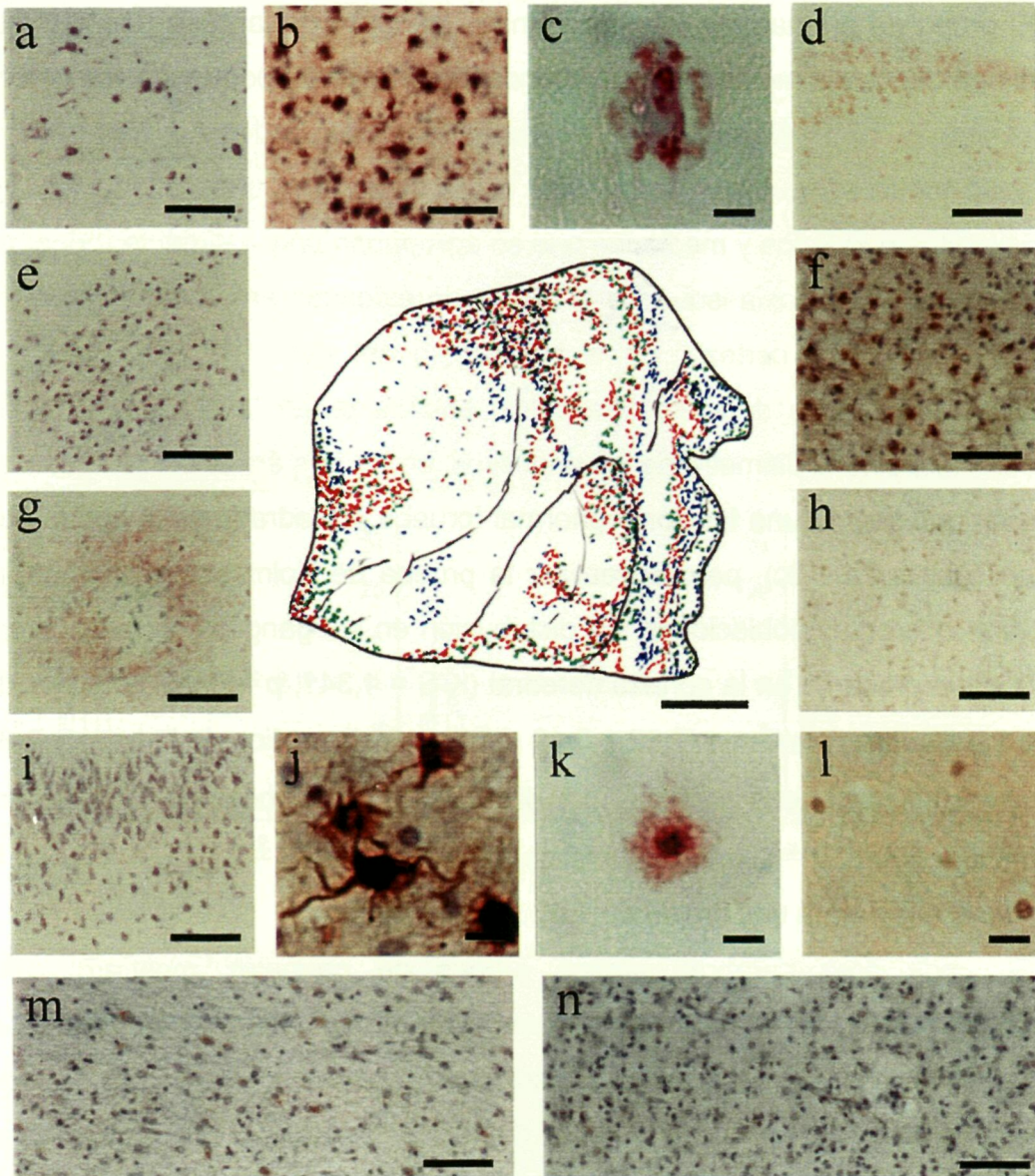
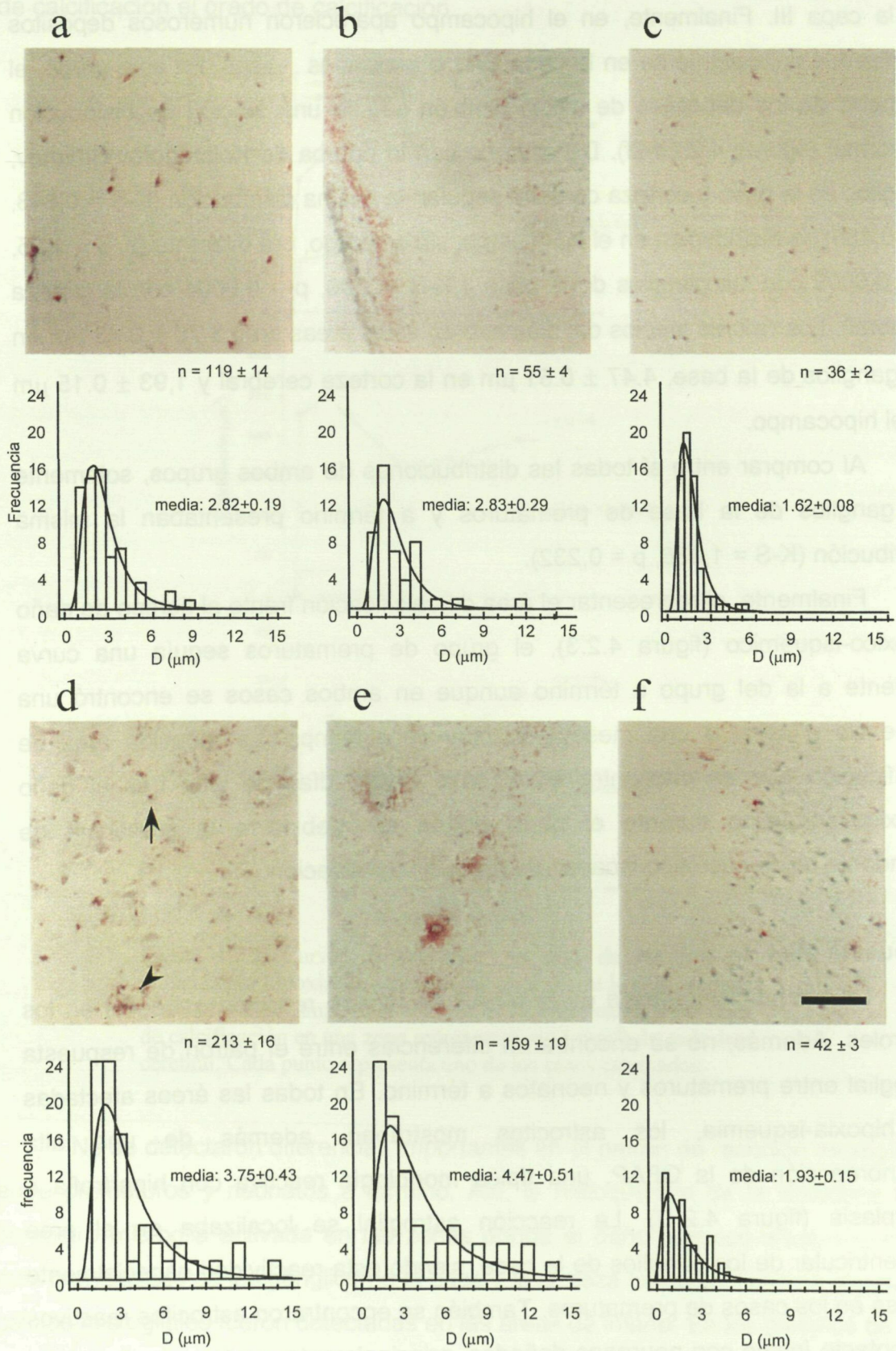


Figura 4.2.1: Dibujo esquemático de una sección cerebral representativa, al nivel de los ganglios de la base, de un prematuro afectado de hipoxia-isquemia. La astrogliá reactiva (puntos azules) estaba asociada con el daño neuronal, es decir localizada principalmente en la eminencia germinal, periventricularmente en el tálamo, en el tercio superior del putamen, en el surco talámico-caudado, y en la corteza cerebral. La reacción microglial (puntos verdes) estaba restringida a las áreas donde se encontraban los depósitos de calcio (puntos rojos). Características similares se observaron en los neonatos a término y están ilustradas en las fotografías. (a) Ganglios de la base teñidos con violeta de cresilo y mostrando células picnóticas. (b) La inmunolocalización de la GFAP contrastada con hematoxilina mostró una reacción astrogliá en los ganglios de la base. (c) Calcio intraneuronal en los ganglios de la base teñido con rojo de alizarina. (d) Microglia reactiva periventricular teñida con la isolectina B₄. (e) Área de vacuolación en la corteza cerebral teñida con violeta de cresilo. (f) Reacción astrogliá en las capas III y IV de la corteza cerebral. (g) Depósitos de calcio rodeando un área de vacuolación en la corteza cerebral. (h) Microgliosis en la capa III de la corteza cerebral. (i) Tinción de Nissl del CA1 hipocámpal mostrando algunas células picnóticas. (j) Astrocitos reactivos en contacto íntimo con dos neuronas de la corteza cerebral. (k) Depósito de calcio mediano rodeado de numerosos depósitos pequeños. (l) Microcitos reactivos en los ganglios de la base. Tinción inmunohistoquímica de la GFAP contrateñida con hematoxilina en los ganglios de la base (m) y de la corteza cerebral (n) de individuos control. Barra: 5 mm en el dibujo; 70 μ m en (a,b, d - i,m,n); 16 μ m en (c y j - l).

El grupo de prematuros mostraba en los ganglios de la base una discreta presencia de depósitos medianos y un abundante número de pequeños, los cuales se presentaban tanto organizados en vastas colonias periventriculares como asociados a vasos sanguíneos. La corteza cerebral, por su parte, mostraba unos pocos depósitos pequeños y medianos que se agrupaban principalmente rodeando áreas afectadas por hipoxia-isquemia o cubriendo extensas áreas paralelas a las capas I y III de dicha corteza. En el hipocampo del grupo de prematuros se encontraron muy pocos depósitos de calcio solamente en la capa CA1 de la estructura. Respecto al diámetro de los depósitos, en las tres áreas presentaba una distribución que seguía una función lognormal (prueba ji-cuadrado de la bondad de ajuste en figuras 2a - 2c), pero al realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov se encontraron diferentes poblaciones. La distribución en los ganglios de la base era diferente de la presente en la corteza cerebral (K-S = 1,341, $p = 0,054$) a pesar de que sus medias eran similares ($2,82 \pm 0,19 \mu\text{m}$ para los ganglios de la base y $2,83 \pm 0,29 \mu\text{m}$ para la corteza cerebral). La distribución del hipocampo también era distinta (K-S = 3,425, $p = 0$ con los ganglios de la base y K-S = 2,975, $p = 0$ con la corteza cerebral) y tenía una media de $1,62 \pm 0,08 \mu\text{m}$.

En cada área cerebral, ambos grupos de neonatos mostraron una distribución de depósitos de calcio similar, siendo mayor en número y tamaño en el grupo a término. De esta manera, en los ganglios de la base de los casos a término aparecían de forma generalizada tanto depósitos pequeños como medianos, encontrándose tanto en el parénquima cerebral como en el citoplasma e incluso el núcleo de algunas neuronas (figura 4.2.1c). La corteza cerebral, a su vez, se encontraba densamente calcificada y la mayor parte de esos depósitos estaba

Figura 4.2.2: Imágenes histológicas de depósitos de calcio teñidos con rojo de alizarina, junto con los histogramas de frecuencias de los diámetros de los depósitos de calcio. El ajuste a distribuciones lognormales muestra la presencia de una sola población de depósitos en cada área. (a) Ganglios de la base de prematuros, parámetros de la prueba de bondad de ajuste: $\chi^2 = 4.869$, 3 g.l., $p = 0.18$. (b) Corteza cerebral de prematuros ($\chi^2 = 4.358$, 3 g.l., $p = 0.11$). (c) hipocampo de prematuros ($\chi^2 = 7.358$, 4 g.l., $p = 0.11$). (d) Ganglios de la base de neonatos a término ($\chi^2 = 5.440$, 3 g.l., $p = 0.14$). (e) Corteza cerebral de neonatos a término ($\chi^2 = 5.835$, 3 g.l., $p = 0.12$). (f) Hipocampo de neonatos a término ($\chi^2 = 1.983$, 3 g.l., $p = 0.57$). Los depósitos de calcio estaban asociados a neuronas (cabeza de flecha) y a astrocitos (flecha). χ^2 , valor de la ji-cuadrado; g.l., grados de libertad; p, probabilidad del valor de la prueba; n, número medio de depósitos en cada zona representativa de cada área cerebral Barra: 70 μm



organizada en colonias alrededor de áreas afectadas por la hipoxia (figura 4.2.1g) y en la capa III. Finalmente, en el hipocampo aparecieron numerosos depósitos localizados principalmente en la capa CA1 o asociados a vasos. En este grupo, el diámetro de los depósitos de calcio también seguía una función de distribución lognormal (figuras 4.2.2d-2f). De acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, ganglios de la base y corteza cerebral seguían la misma distribución (K-S = 0,843, $p = 0,489$), la distribución en el hipocampo, sin embargo, era diferente (K-S = 1,95, $p = 0,0009$ con los ganglios de la base y K-S = 2,03, $p = 0,0004$ con la corteza cerebral). Los valores medios del diámetro en estas áreas eran $3.75 \pm 0.43 \mu\text{m}$ en los ganglios de la base, $4.47 \pm 0.51 \mu\text{m}$ en la corteza cerebral y $1,93 \pm 0.15 \mu\text{m}$ en el hipocampo.

Al comparar entre sí todas las distribuciones de ambos grupos, solamente los ganglios de la base de prematuros y a término presentaban la misma distribución (K-S = 1,036, $p = 0,232$).

Finalmente, al representar el área de calcificación frente al tiempo de daño hipóxico-isquémico (figura 4.2.3), el grupo de prematuros seguía una curva diferente a la del grupo a término aunque en ambos casos se encontró una tendencia a llegar a una meseta en muy poco tiempo. La reducida área de calcificación que se encuentra en el caso de 60 días de vida tras el daño hipóxico-isquémico durante el parto podría ser debido a la presencia de abundante tejido necrótico incapaz de producir calcificación.

respuesta glial

La inmunohistoquímica de la GFAP no mostró reacción astrogliar en los controles. Además, no se encontraron diferencias entre el patrón de respuesta astrogliar entre prematuros y neonatos a término. En todas las áreas afectadas de hipoxia-isquemia, los astrocitos mostraban, además de una alta inmunoreacción de la GFAP, una típica morfología reactiva con hipertrofia e hiperplasia (figura 4.2.1j). La reacción astrogliar se localizaba en el área periventricular de los ganglios de la base, siendo esta reactividad especialmente intensa en los casos de prematuros. También se encontraron astrocitos reactivos en contacto íntimo con neuronas dañadas, principalmente en los ganglios de la base (figura 4.2.1b) y las capas III y IV de la corteza cerebral de los casos a

término (figura 4.2.1f). No se pudo establecer ninguna correlación con el grado de calcificación el grado de calcificación

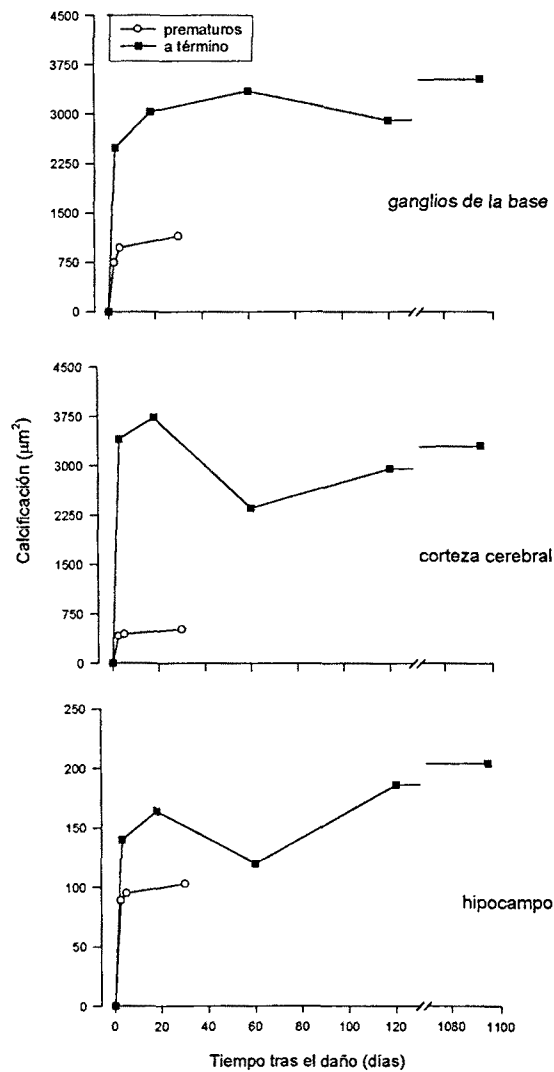


Figura 4.2.3: Curvas de evolución del área de calcificación inducida por hipoxia-isquemia en los ganglios de la base, corteza cerebral e hipocampo. Los valores están expresados como área de calcificación en una zona representativa (1 mm²) de cada área cerebral. Cada punto representa uno de los casos estudiados.

No se detectaron diferencias importantes en el patrón de reacción microglial entre prematuros y neonatos a término. Así, la histoquímica de la isolectina B₄ demostró microglia activada en las zonas donde el daño hipóxico-isquémico era más pronunciado de los ganglios de la base y la corteza cerebral. Además algunas células microgliales fueron detectadas en las áreas de infarto. En los ganglios de la base la microglía ameboide era especialmente abundante en el área

periventricular, donde tanto la muerte cerebral como la calcificación eran más severas (figuras 4.2.1d, 4.2.1l). Por su parte, se detectó microglía reactiva en las capas I y III de la corteza cerebral afectada de hipoxia-isquemia, donde también se localizaban los depósitos de calcio. Sin embargo en neonatos a término, capas pobres en calcificación como la V y la VI también presentaban la mencionada reacción microglial. Finalmente, no se detectó reacción microglial en ninguna capa de los hipocampos ni en las muestras control.

DISCUSIÓN

Estos resultados destacan la presencia de calcificación cerebral inducida por hipoxia-isquemia durante el periodo perinatal e indican una vulnerabilidad diferencial dependiente de la edad. Los depósitos de calcio descritos tanto en cerebro humano como en modelos animales de neurodegeneración tienen una estructura cristalina y una composición de hidroxapatito similar a la de aquellos aparecidos en tejido no nervioso (Honda *et al.* 1994, Khan *et al.* 1986, Kim 1995, Mahy *et al.* 1999). Dos de las principales consecuencias del daño hipóxico-isquémico en las neuronas son la acidosis inducida por lactato y un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Longo 1997), lo que podría ser debido a una reducción de la conductancia del K^+ y la facilitación de los potenciales de acción (Madshus 1988). En esas neuronas, la reducción del pH potencia la formación de $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} a partir de fosfato inorgánico (Farooqui *et al.* 1994). Debido a la alta afinidad del Ca^{2+} por los iones fosfato se iniciaría la cristalización del hidroxapatito la cual se constituiría en el embrión de una calcificación cerebral. Por otro lado, los aumentos crónicos de glutamato y aspartato extracelulares en áreas que son particularmente vulnerables a la hipoxia-isquemia (Barks *et al.* 1992, Hagberg *et al.* 1994, Jørgensen *et al.* 1982) podrían sobreactivar los receptores postsinápticos excitadores e incrementar el flujo de Ca^{2+} al interior celular (Katayama *et al.* 1995, Longo 1997).

En ratas, la activación aguda de los receptores de EAA con kainato, ibotenato, quisqualato, NMDA o AMPA induce con el tiempo a una precipitación progresiva de calcio en numerosas áreas del SNC (Bernal *et al.* 2000b, Korf *et al.* 1984, Mahy *et al.* 1995, Nitsch *et al.* 1992, Petegnief *et al.* 1999). En consecuencia, la sobreactivación de los receptores de los EAA no solamente

colaboraría el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ necesario para iniciar la cristalización del apatito sino que también tendería a convertir el proceso en crónico, con el subsiguiente crecimiento de la estructura cristalina tanto en el citoplasma como el núcleo de algunas neuronas. Esto indicaría que la modificación hipóxico-isquémica de la homeostasis del calcio mediante la precipitación del ion podría alterar las actividades nucleares en ciertas células.

A pesar de la abundante literatura sobre la participación del glutamato en este proceso (De Keyser *et al.* 1999, Hagberg *et al.* 1994, Panigrahy *et al.* 1995, Rosenblum 1997), la baja densidad de receptores de NMDA en las áreas más sensibles al daño neuronal inducido por hipoxia-isquemia es uno de los argumentos de más peso en contra de la hipótesis de los EAA para el daño hipóxico-isquémico (Longo 1997). Sin embargo, se ha observado calcificación en numerosas áreas cerebrales tras el tratamiento con AMPA (Mahy *et al.* 1999, Petegnief *et al.* 1999, y ver sección 4.1). Además, como ya se ha descrito (Ozawa *et al.* 1998), el mGluR I libera calcio desde las cisternas intracelulares e incrementa la respuesta del receptor de NMDA (Pisani *et al.* 1997), incluso en presencia de D-2-amino-5-fosfonovalerato, un antagonista de éste receptor (Wang *et al.* 1996). En los ganglios de la base, la corteza cerebral y el hipocampo, áreas que son especialmente vulnerables a la hipoxia-isquemia, el alto número de mGluR I podría compensar la baja densidad de los receptores de NMDA (Hollmann *et al.* 1994, Ozawa *et al.* 1998). Lo que explicaría la especial sensibilidad de esas áreas a la excitotoxicidad (Longo 1997) y a la calcificación debida al NMDA (Bernal *et al.* 2000b). De esta forma el receptor A_1 de la adenosina (presináptico) disminuye la actividad glutamatérgica y previene los ataques epilépticos; su bloqueo con cafeína durante la anoxia induce a la epilepsia en el hipocampo de ratas neonatas (Dzala *et al.* 1999). Además, se ha descrito recientemente (Bond *et al.* 1999) que la protección a la isquemia global en el cerebro del gerbo tras la activación de los mGluR II (el receptor de glutamato presináptico acoplado de forma negativa a la adenilato ciclasa) podría interferir con la activación de los mGluR I. Todos estos datos indican que la vulnerabilidad cerebral a la hipoxia-isquemia y la calcificación depende no sólo de los movimientos de calcio y la densidad de los receptores de glutamato, sino también de del subtipo de receptor involucrado con una particular importancia del

mGluR1. Finalmente, la escasa calcificación encontrada en este estudio podría estar relacionada con la inmadurez del sistema presináptico de los EAA (Owens *et al.* 1997, Rothe *et al.* 1983) y la limitada liberación hipocampal de EAA en hipoxia-isquemia durante el desarrollo cerebral (Cherici *et al.* 1991).

En condiciones similares de tiempo post-traumático, los neonatos prematuros presentaban menos calcificación que los neonatos a término, hecho que también puede ser debido a diferencias en madurez, como sugieren el incremento en las variaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la hipoxia-isquemia que sufren los animales adultos (Nyakas *et al.* 1996) y el aumento de calcificación observado en el cerebro humano adulto si se compara con el de neonatos (Kobari *et al.* 1997). El cerebro embrionario oxida más cuerpos cetónicos que glucosa debido a que no expresa suficiente GLUT 1, el cual transporta glucosa a través del plexo coroideo (Zierler 1999). En lo que respecta a su mayor resistencia a la hipoxia-isquemia, las neuronas inmaduras pueden necesitar menos energía (Nehlig *et al.* 1993, Nyakas *et al.* 1996) y adaptarse mejor al metabolismo anaeróbico como se ha visto en ratas menores de 10 días (Bomont *et al.* 1992), es decir antes del equivalente al humano totalmente desarrollado (Dobbing 1971). Así, en el cerebro humano de los neonatos prematuros se acumularía una cantidad limitada de lactato resultando en un limitado decremento de pH tanto extra como intracelular. Este decremento, a su vez, sería mejor tolerado debido a que la barrera hematoencefálica no está totalmente cerrada (Nyakas *et al.* 1996). En los neonatos a término, los aumentos de actividad y de disponibilidad de glucosa llevarían a una mayor producción de lactato durante la hipoxia causando una acidosis más severa, con una marcada reducción de la conductancia del K^+ , aumento de la despolarización de la membrana y aumento de $[Ca^{2+}]_i$ e iones fosfato libres, lo que a la postre llevaría al incremento de la precipitación del calcio. En ambos grupos, el grado de calcificación alcanza una meseta a los pocos días, sugiriendo que los mecanismos que reducen la excitotoxicidad y el daño hipóxico-isquémico podrían disminuir la formación de los precipitados de calcio, e incluso estimular su desaparición (Liévens *et al.* 2000)

La astroglia se activa al suceder un daño cerebral y los astrocitos reactivos proporcionan un soporte trófico a las neuronas y podrían controlar

además el contenido iónico del compartimento extracelular (Takeda *et al.* 1999). Algunos estudios sugieren que el glutamato estimula el metabolismo anaeróbico glial con la subsiguiente liberación de lactato, el cual se constituye en un substrato para las neuronas dañadas que no tienen suficiente glucosa (Larrabee *et al.* 1995, Larrabee *et al.* 1996, Magistretti *et al.* 1999). Por otro lado, en simios tratados con MPTP, la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales está asociada con un dramático incremento de lactato que se mantiene hasta 10 meses (Brownell *et al.* 1998). Se sabe que en humanos el incremento de lactato extracelular observado durante la hipoxia proviene de los astrocitos (Sibson *et al.* 1998). Todo ello resulta en una acidosis general y un aumento de los iones fosfato. En consecuencia, las células astrogliales, directamente involucradas en la precipitación del calcio asociado con excitotoxicidad y neurodegeneración (Mahy *et al.* 1999), también inducirían a la calcificación durante la hipoxia-isquemia. Como se ha descrito en el cerebro de la rata (Saura *et al.* 1995, Mahy *et al.* 1999), hemos encontrado que en los ganglios de la base y la corteza cerebral los precipitados de calcio están asociados con una reacción microglial. La falta de la mencionada reacción en el hipocampo está en concordancia con un estudio previo en tejido postmortem humano afectado de isquemia, en el cual no se encontró microgliosis alguna en el CA1 hipocampal (Barron 1995). Por añadidura, los escasos pequeños depósitos encontrados en éste estudio podrían no ser suficientes para activar los microcitos.

Para concluir podemos decir que el sistema de neurotransmisión glutamatérgico y la acidosis láctica parecen tener una función clave en la calcificación inducida por hipoxia-isquemia perinatal. Comparando ambas edades, las diferencias de vulnerabilidad a la hipoxia-isquemia y a la calcificación observadas en todas las áreas estudiadas sugieren una interdependencia de ambos procesos. Si esto se confirmara, la calcificación cerebral, que es fácilmente visible por tomografía computerizada (López Villegas *et al.* 1996), podría resultar útil en el seguimiento de la neuropatología y la evolución clínica de la hipoxia-isquemia. Queda por determinar si su prevención a través de la combinación de la reducción en la transmisión sináptica glutamatérgica no mediada por el receptor NMDA resulta en una reducción de las secuelas neurológicas.



4.3

Cambios histológicos y neuroquímicos
provocados por la lesión del septo medio con
AMPA

4.3:

CAMBIOS HISTOLÓGICOS Y NEUROQUÍMICOS PROVOCADOS POR LA LESIÓN DEL SEPTO MEDIO CON AMPA

INTRODUCCIÓN

La vía SH controla la actividad neuronal en todos los estratos hipocampales (ver revisión de Dutar *et al.* 1995). Las fibras colinérgicas de la vía emiten aferencias principalmente a la capa piramidal del CA y a la granular de la circunvolución dentada células todas ellas que reciben a su vez aferencias glutamatérgicas corticales. También las células de la capa *oriens* del CA, neuronas GABAérgicas que son ricas en parvalbúmina, reciben estas aferencias colinérgicas (Freund *et al.* 1996). Por su parte, las células GABAérgicas de la vía SH inervan principalmente interneuronas hipocampales (Freund *et al.* 1988). Todo ello se traduce en el hipocampo en una gran cantidad de diferentes receptores mediante los que la acetilcolina y el GABA ejercen su control de la función hipocampal. Así, en el hipocampo se pueden encontrar los dos tipos de receptores de acetilcolina, con importante predominio de los muscarínicos (Vilaro *et al.* 1994). De ellos los M₁ son los más abundantes se encuentran distribuidos por todo el hipocampo (Cortés *et al.* 1986) y se muestran particularmente implicados en las funciones cognitivas (Boddeke *et al.* 1992, Guzmán *et al.* 1992). El GABA, por su parte, ejerce su función inhibitoria tanto en la neurona presináptica a través de sus receptores GABA_A, como en la postsináptica a través de los receptores GABA_B y GABA_C. En el hipocampo se han identificado los tres tipos de receptores (Bowery *et al.* 1987) los GABA_A concretamente se localizan tanto en las dendritas como en el soma de las células hipocampales. (Dutar *et al.* 1988).

Por otro lado, el glutamato es uno de los principales neurotransmisores en el hipocampo y está implicado en el control de las funciones cognitivas de dicha estructura sensibles a la edad (Miyoshi *et al.* 1991, Le Jeune *et al.* 1996). El Glu ejerce su función a través de diferentes receptores de los cuales los NMDA son exclusivamente postsinápticos (Ozawa *et al.* 1998). Entre otros

efectos, se ha observado que la actividad de los receptores NMDA controla la liberación de colina en el hipocampo (Zapata *et al.* 1998) lo que apunta a la excitación de estos receptores como un factor modulador de los niveles *in vivo* de acetilcolina (Zapata *et al.* 2000). También se ha observado que las lesiones de la fimbria y el fórnix provocan alteraciones en el número de estos receptores en el hipocampo (Geddes *et al.* 1992, Lhatinen *et al.* 1993).

Finalmente, la inyección estereotáxica de AMPA en el MS de la rata tiene consecuencias comportamentales similares a las observadas durante el envejecimiento y deteriora las funciones cognoscitivas controladas por el hipocampo (McAlonan *et al.* 1995, Waite *et al.* 1994). Bioquímicamente, la lesión excitotóxica en el MS inicia un proceso neurodegenerativo caracterizado por una pérdida de la función colinérgica que se ve reflejada en el hipocampo con una disminución de los valores de diferentes parámetros colinérgicos, como la liberación del neurotransmisor inducida por K^+ , la actividad de la ChAT y del transportador de alta afinidad de colina (Quirion 1987, McAlonan *et al.* 1995, Waite *et al.* 1994, Zapata *et al.* 2000). Pero además se observan otros efectos como el aumento a largo plazo de la expresión de factores de crecimiento como el BDNF (Mahy *et al.* 1996), indicador de los mecanismos de compensación activados durante el proceso neurodegenerativo inducido por la lesión excitotóxica del MS.

Una vez caracterizada tanto en el tiempo como en la dosis, nos propusimos indagar en los efectos que pudiera tener en el hipocampo la lesión septal inducida por AMPA tanto en términos histológicos como funcionales. Para ello, se estudiaron los posibles cambios morfológicos en el hipocampo y las reacciones astro y microglial; esta última mediante la localización autorradiográfica del PBR utilizando el [3 H]PK-11195 como marcador específico (Stephenson *et al.* 1995). Además, estudiamos los posibles mecanismos de plasticidad inducidos en los receptores colinérgicos y GABAérgicos, así como en los receptores postsinápticos del glutamato. Para ello se evaluó, mediante autorradiografía *in vitro* con [3 H]QNB, los efectos de la lesión en los niveles de receptores colinérgicos (Nagasawa *et al.* 1994, Odonera *et al.* 1987) y los efectos sobre los GABA_A utilizando [3 H]muscimol (Kumar *et al.* 1993, Sihver *et al.* 1997). Además se incluyó en el estudio el análisis de los receptores NMDA

(postsinápticos) del glutamato mediante la localización autorradiográfica de los lugares de unión del [³H]MK-801 (Beaton *et al.* 1992, Petegnief *et al.* 1999).

METODOLOGÍA UTILIZADA

El experimento se realizó con once animales. Mediante estereotaxia, se inyectaron 0,5 μ L de AMPA 5,4 mM (6 ratas) o de PBS 50 mM (5 ratas) en el septo medio.

Análisis tisular

Los animales fueron anestesiados, decapitados y su cerebro rápidamente extraído y congelado con nieve carbónica. Con el criostato, se obtuvieron cortes coronales seriados de 12 μ m de grosor a la altura del lugar de inyección y del hipocampo dorsal; siendo las coordenadas 0,7 mm rostral y 3,3 mm caudal a *bregma* respectivamente –siempre según el atlas de Paxinos *et al.* (1986)-. Sobre esos cortes se realizaron las siguientes experiencias:

- ☞ Tinción de Nissl.
- ☞ Tinción contrastada de alizarina.
- ☞ Localización histoquímica de la actividad AChE.
- ☞ Tinción inmunohistoquímica de la GFAP.
- ☞ Tinción inmunohistoquímica de la $\gamma\gamma$ -enolasa.
- ☞ Fijación *in vitro* de [³H]PK-11195 a secciones de tejido.
- ☞ Fijación *in vitro* de [³H]QNB a secciones de tejido.
- ☞ Fijación *in vitro* de [³H]muscimol a secciones de tejido.
- ☞ Fijación *in vitro* de [³H]MK-801 a secciones de tejido.

Análisis cuantitativo

- ☞ Se midió el tamaño del área septal y de la formación hipocampal sobre secciones teñidas con violeta de cresilo.
- ☞ La muerte neuronal en el septo medio se calculó con el recuento de neuronas al microscopio óptico a 100 aumentos. Se contó el número de neuronas $\gamma\gamma$ -enolasa positivas en el septo medio y en tres áreas del hipocampo: el estrato piramidal del CA1, el estrato granular de la circunvolución dentada y la

capa radiada del hipocampo. Los factores de corrección de Floderus ascendían a 0,86 en el SM y a 0,8 en el hipocampo (ver *Materiales y Metodología General*).

☞ El marcaje de la tinción de AChE se calculó midiendo la densidad óptica en escala de grises relativa (0-256).

☞ La cuantificación de la reacción microglial y de receptores se realizó a dos niveles. En la zona de 0,7 mm rostral a *bregma* se hizo delimitando los septos medio y lateral y tomando como controles de referencia el núcleo estriado, la corteza parietal y la corteza granular insular. En la zona de 3,3 mm dorsal a *bregma* se hizo de forma diferente bien fuera para la cuantificación de la reacción microglial o para la de los receptores. En la primera se delimitaron los hipocampos derecho e izquierdo, tomando como controles las cortezas parietal y perirrinal. Por su parte la cuantificación de receptores se hizo delimitando cada uno de los estratos de la formación hipocampal por separado y tomándose como controles las mismas áreas corticales.

Análisis estadístico

Para cada variable, los valores de las ratas operadas con vehículo se compararon con los de las ratas lesionadas con AMPA por medio de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Todos los resultados están expresados como la media \pm SEM. El número de neuronas se expresa como porcentaje respecto al control en el septo medio y como densidad (número de neuronas / área) en las diferentes áreas hipocampales.

RESULTADOS

Estimación de la lesión

Dos meses tras la inyección de AMPA en el MS se observó una reducción significativa ($U = 19,0$; $p < 0,05$) del 31% en el área septal. Esta reducción se correspondía con una pérdida neuronal del 62% en el SM y la parte vertical de la DBB ($U = 20,0$; $p < 0,05$). Además se encontró un 7% de reducción significativa ($U = 27,0$; $p < 0,05$) de la tinción de AChE en el septo medio pero no en el lateral.

Al realizar la tinción contrastada de alizarina, dos de las ratas lesionada mostraron depósitos de calcio en el SM en el lugar de inyección. En estos

animales los depósitos eran del tipo *pequeños*, y el área que ocupaban escapaba, por ínfima, a los límites de detección de nuestro sistema.

La tinción inmunohistoquímica de la GFAP mostró al microscopio óptico una reacción astrogliar limitada a la cicatriz dejada por la aguja en el momento de inyección. En ningún animal se apreció astrogliosis en el resto del área septal. Por su parte, la autorradiografía con [³H]PK11195 mostró niveles muy bajos de unión en todas las áreas estudiadas. En ningún animal, ni en los controles ni en los operados con AMPA, se observó un incremento de unión específica al PBR en ninguna área incluyendo el MS y el lateral (tabla 4.3.1).

Tabla 4.3.1: Fijación específica de [³H]PK-11195 en diversas áreas tras lesión en el SM

Área cerebral	Control	AMPA
<i>+0,7 mm a bregma</i>		
Septo medio	591 ± 38	590 ± 39
Septo lateral	513 ± 29	529 ± 32
Núcleo estriado	496 ± 38	436 ± 28
Corteza parietal	448 ± 40	376 ± 26
Corteza granular insular	436 ± 46	426 ± 28
<i>-3,3 mm a bregma</i>		
Hipocampo derecho	507 ± 20	483 ± 38
Hipocampo izquierdo	461 ± 9	459 ± 23
Corteza parietal	494 ± 28	433 ± 34
Corteza perirrinal	362 ± 16	439 ± 17

Los valores corresponden a la media ± SEM y están expresados como fmol/mg prot.

Efectos en el hipocampo

Dos meses después de la lesión septal, la medición del área de ambos hipocampos mostró una pequeña atrofia que no era significativa estadísticamente. Igualmente, tras el recuento neuronal no se observaron variaciones importantes en ninguna de las estructuras hipocampales estudiadas (tabla 4.3.2, figura 4.3.1). Sin embargo, la tinción histoquímica de la AChE mostró una reducción significativa del 6% en el estrato piramidal del CA3 (U = 22,0; p < 0,05). En el CA1 la reducción no alcanzó la significación estadística, mientras que en el resto de estratos hipocampales y de la circunvolución dentada la actividad se mantuvo. (figura 4.3.1)

Los astrocitos hipocampales mostraron una morfología no reactiva, sin hipertrofia, hiperplasia ni alta inmunoreacción a la GFAP en ninguno de los animales, tanto en las ratas control como en las operadas con AMPA (figura 4.3.1). Del mismo modo, la cuantificación del PBR mostró niveles similares a las del área septal (tabla 4.3.1) y no se apreció ningún tipo de reacción microglial en ninguna de las áreas estudiadas, incluyendo el hipocampo.

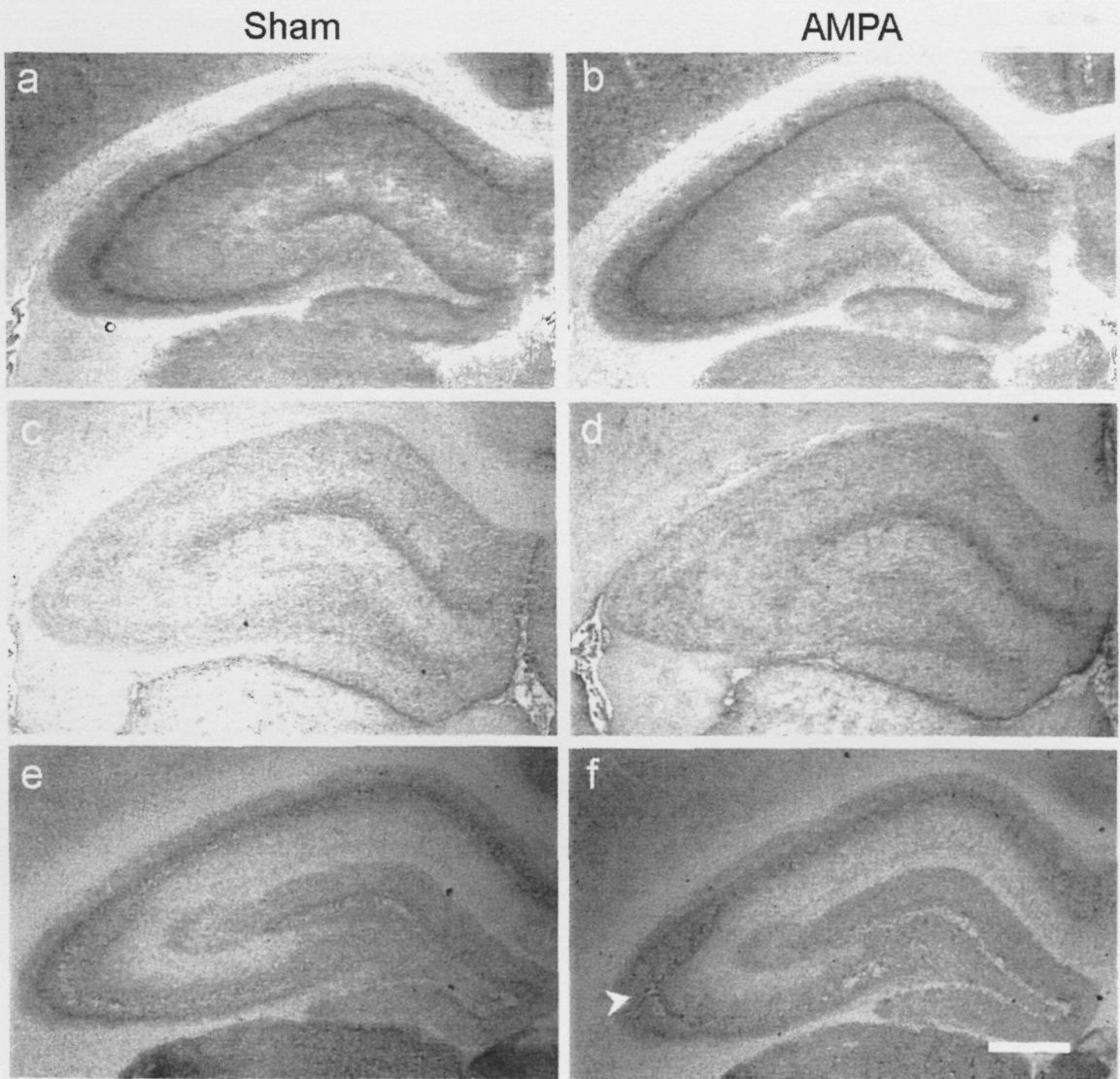


Figura 4.3.1: γ -enolasa, GFAP y AChE histoquímica en secciones coronales del hipocampo tras la lesión excitotóxica en el MS. La lesión septal de AMPA no provocó ningún cambio en la inmunoreactividad de la γ -enolasa (a,b) ni en la de la GFAP (c,d) en el hipocampo. La localización de la actividad AChE (e,f) sí que se vio afectada en el CA3 (punta de flecha). Barra: 50 μ m.

Tabla 4.3.2: Densidad neuronal en el hipocampo tras la lesión septal con AMPA

Área cerebral	Control	AMPA
Piramidal CA1	974 ± 43	922 ± 40
Radiada	133 ± 23	132 ± 32
Granular circunvolución dentada	2.013 ± 98	2.066 ± 125

Las unidades son n° neuronas / mm² y están expresadas como la media ± SEM.

Autorradiografía *in vitro*

El marcaje autorradiográfico de los receptores muscarínicos M₁ con [³H]QNB era alto en la gran mayoría de las áreas cerebrales especialmente en la corteza y todos los estratos de la capa CA1 del hipocampo (tabla 4.3.3, figura 4.3.2). La unión no específica del ligando era homogénea y baja, llegando a menos del 12% de la unión específica en las áreas corticales. En los animales lesionados no se observó ninguna variación significativa en los niveles de unión de [³H]QNB en ninguna de las áreas, incluyendo la lesionada.

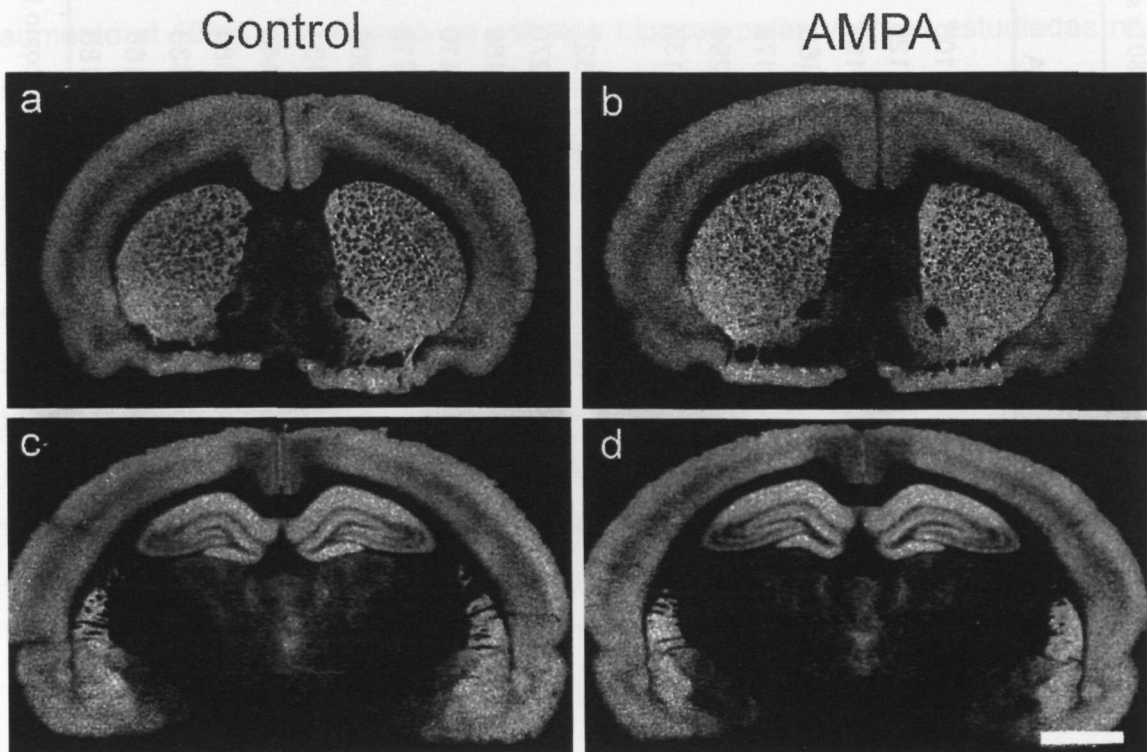


Figura 4.3.2 Distribución de los lugares de unión *in vitro* de [³H]QNB en secciones coronales de cerebro de rata. La lesión septal con AMPA no provocó ningún cambio en la unión específica del ligando ni en el lugar de inyección (a, b) ni al nivel del hipocampo (c,d). Barra: 2 mm.

Tabla 4.4.3: Unión *in vitro* de [³H]QNB, [³H]muscimol y [³H]MK-801 a secciones cerebrales de rata.

Área cerebral	[³ H]QNB		[³ H]muscimol		[³ H]MK-801	
	Control	AMPA	Control	AMPA	Control	AMPA
+0,7 mm a Bregma						
Septum medio	2099 ± 205	1909 ± 103	1132 ± 82	1187 ± 114	112 ± 52	73 ± 52
Septum lateral	2422 ± 186	2655 ± 126	1395 ± 89	1369 ± 75	1703 ± 118	2092 ± 159
Núcleo estriado	4404 ± 251	4826 ± 197	1261 ± 64	1327 ± 107	1747 ± 101	1898 ± 93
Corteza frontal (I-III)	4552 ± 170	4874 ± 168	2754 ± 94	2772 ± 71	3843 ± 93	3754 ± 220
Corteza frontal (IV-VI)	4331 ± 191	4539 ± 175	2068 ± 69	2193 ± 59	895 ± 101	840 ± 253
Corteza insular (I-III)	4588 ± 214	4806 ± 298	2275 ± 61	2235 ± 51	3951 ± 156	3926 ± 191
Corteza insular (IV-VI)	4301 ± 124	4396 ± 137	1709 ± 141	1750 ± 137	2324 ± 152	2689 ± 231
-3,3 mm a Bregma						
CA1 oriens	4902 ± 393	5214 ± 327	1221 ± 88	1340 ± 109	7416 ± 275	7189 ± 129
CA1 piramidal	5629 ± 130	5931 ± 270	1213 ± 87	1423 ± 112	1830 ± 362	1721 ± 224
CA1 radiada	5589 ± 180	5797 ± 186	1198 ± 101	1040 ± 52	8676 ± 312	8606 ± 389
CA3 oriens	3731 ± 260	3840 ± 410	235 ± 31	487 ± 49 **	4366 ± 284	3940 ± 305
CA3 piramidal	3969 ± 169	3704 ± 213	219 ± 44	472 ± 50 **	1875 ± 237	1942 ± 281
CA3 radiada	3845 ± 223	4003 ± 306	154 ± 29	548 ± 49 **	4244 ± 325	4352 ± 222
Lacunosum moleculare	3898 ± 118	4133 ± 137	1065 ± 43	1076 ± 79	4804 ± 198	4939 ± 316
Circunvol. dentada dorsal	4733 ± 406	4541 ± 448	1262 ± 214	1570 ± 109	6532 ± 171	6683 ± 250
Circunvol. dentada ventral	4881 ± 375	5094 ± 388	1690 ± 174	1578 ± 102	6743 ± 370	6817 ± 336
<i>Hilus</i>	3929 ± 391	4291 ± 333	382 ± 61	757 ± 47 **	1881 ± 133	1801 ± 173
Corteza parietal	5336 ± 124	5329 ± 168	2279 ± 171	2269 ± 120	3031 ± 220	2985 ± 223
Corteza peririnal	4618 ± 110	4352 ± 188	942 ± 63	940 ± 1002	3470 ± 187	3485 ± 256

Los valores corresponden a la media ± SEM y están expresados como fmol/mg prot. **, p < 0,01 respecto al control

La cuantificación de la unión específica de [³H]muscimol en las secciones cerebrales mostró niveles moderados (entre 1.000 y 2.000 fmo/mg prot) en el área septal, el núcleo estriado y en las capas internas de la corteza frontal. En las capas externas de ésta última área los niveles de unión del ligando eran algo mayores (tabla 4.3.3, figura 4.3.3). En el hipocampo la unión específica de [³H]muscimol era especialmente baja en todos los estratos del CA3 y el *hilus*, mostrando valores muy inferiores a 1.000 fmo/mg prot. El resto de estratos hipocampales mostró niveles moderados de unión de ligando. La unión no específica era homogénea y muy pequeña, representando menos del 10% de la total. Al estudiarse el efecto de la lesión excitotóxica en el SM no se observaron cambios significativos en la cantidad de [³H]muscimol unida, ni tampoco en el septo lateral. Sin embargo, todos los estratos de la capa CA3 del hipocampo de las ratas lesionadas presentaron un aumento significativo del 220% en los lugares de unión de [³H]muscimol (tabla 4.3.3, figura 4.3.3), este aumento era especialmente importante en el estrato radiado donde llegó al 350%. De la misma manera, el ligando mostró una mayor unión en el *hilus*, llegando este aumento al 198%. En el resto de estratos hipocampales y áreas estudiadas no se observaron ningún cambio significativo en la unión de ligando.

La cuantificación de los lugares de unión al receptor NMDA mostró niveles muy bajos (menos de 1000 fmo/mg prot) en el MS, y también en las capas internas de la corteza frontal (tabla 4.3.3, figura 4.3.3). El septo lateral y el núcleo estriado mostraron niveles moderados de unión al [³H]MK-801 (entre 1.000 y 2.000 fmo/mg prot) y la corteza niveles muy altos (más de 2.000 fmo/mg prot), al igual que el hipocampo. Esta última área cerebral mostró un patrón de distribución ya conocido con niveles especialmente altos en las capas piramidales del CA y la granular de la circunvolución dentada, y moderados en el CA3 y las capas con una baja densidad neuronal. La unión no específica del ligando era homogénea y representaba menos del 15% de la unión total. Cuando se estudió el efecto de la lesión excitotóxica con AMPA se observó un ligero aumento de la unión de [³H]MK-801 en el septo lateral de las ratas lesionadas, aumento que no llegó a ser significativo. En el resto de las áreas cerebrales, incluyendo el hipocampo, no se observó ningún cambio en la cantidad de unión de [³H]MK-801.

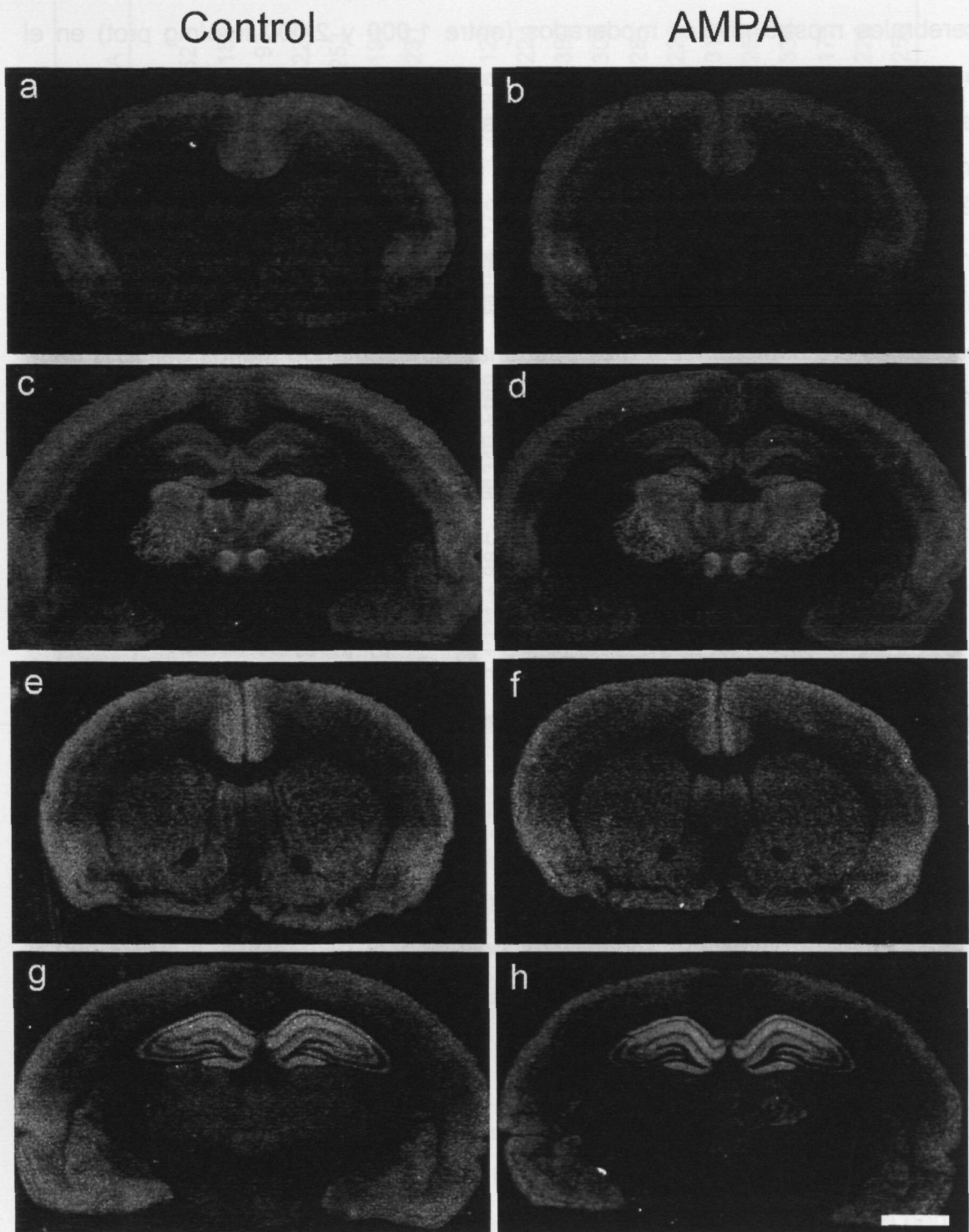


Figura 4.3.3: Distribución de los lugares de unión *in vitro* de $[^3\text{H}]$ muscimol y $[^3\text{H}]$ MK-801 en secciones coronales de cerebro de rata. La inyección de AMPA en el MS no causó ningún cambio de unión específica de $[^3\text{H}]$ muscimol en el área septal (a, b) pero sí en el CA3 y el hilus de la estructura hipocampal (c, d). No hubo alteraciones en la unión específica de $[^3\text{H}]$ MK-801 ni en el lugar de inyección (e, f) ni a nivel del hipocampo (g, h). Barra: 2 mm.

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que el proceso neurodegenerativo en la vía SH inducido por la inyección de AMPA en el MS provoca unos cambios adaptativos en la actividad neuronal del CA3 hipocampal. Estos cambios afectan de forma específica a la función colinérgica y la GABAérgica, caracterizados en la primera por la una disminución de la actividad AChE, mientras que la cantidad de receptores muscarínicos no se ve afectada y el sistema de transmisión GABAérgico ve como la cantidad de los lugares de unión de los receptores GABA_A aumenta. Por su parte, el número de receptores NMDA no varía en todo el complejo hipocampal.

Según los parámetros aquí medidos, no parece que la lesión excitotóxica en el MS provoque un proceso neurodegenerativo en el hipocampo, puesto que no se observa pérdida neuronal, atrofia del área, ni reacción glial de ningún tipo en esta estructura. Sin embargo, tras la inyección de kainato en el MS se ha observado un aumento generalizado de la expresión de BDNF en el hipocampo seguido, a los siete días, de la degeneración en las células piramidales del CA3 (Venero *et al.* 1999). Este mismo incremento de la expresión de BDNF se ha observado, a más largo plazo, en el CA y la capa granular de la circunvolución dentada tras las inyecciones en el MS de ácido quisquálico e iboténico (Boatell *et al.* 1992, Mahy *et al.* 1996) pero sin que llevar asociada una pérdida neuronal. Aunque la desaparición de las redes de terminales nerviosas colinérgicas es muy limitada después de las lesiones septales (Mahy *et al.* 1995), el aumento de este factor neurotrófico se ha interpretado como un intento de mantener la activación de la vía colinérgica septohipocampal, como también parece serlo la reacción astrogliar encontrada en todo el hipocampo, pero especialmente en el CA3 y la circunvolución dentada, siete días después de una lesión en la fimbria y el fórnix (Jeglinski *et al.* 1995). Todos estos resultados, junto con los cambios adaptativos específicos aquí descritos, indicarían una especial sensibilidad del CA3 hipocampal a la lesión excitotóxica del MS. Como también ocurre durante otros procesos neurodegenerativos como la atrofia de las dendritas apicales inducida por la secreción de glucocorticoides (Magariños *et al.* 1995, Watanabe *et al.* 1992) o los ataques epilépticos recurrentes inducidos por fluorotilo en ratas

neonatas, los cuales provocan una desaparición de los terminales de las fibras musgosas en esta parte hipocampal (Holmes *et al.* 1998).

La lesión excitotóxica del MS provoca una dramática pérdida de neuronas colinérgicas (sección 4.1) que se traduce en la reducción de las funciones presinápticas pero no en los niveles *in vivo* de acetilcolina hipocampal (Zapata *et al.* 2000). Por lo que se ha deducido la existencia de unos mecanismos adaptativos capaces de mantener los niveles extracelulares del neurotransmisor. Entre estos posibles mecanismos se ha propuesto la activación de los receptores de NMDA (Zapata *et al.* 2000), cuyos niveles hipocampales hemos encontrado que no varían con la lesión; pero además y como apunta la pérdida de actividad AChE encontrada en el CA3 también podrían incluir la reducción de los sistemas de degradación enzimática. No obstante, también se ha descrito una falta de liberación de acetilcolina inducida por potasio por lo que el estado funcional de las aferencias colinérgicas sí que se ve alterado (Zapata *et al.* 2000). Este hecho se ha de considerar a la hora de interpretar la estabilidad en la cantidad de lugares de unión del [³H]QNB a los receptores muscarínicos aquí descrita y también encontrada en el hipocampo de la rata tras experimentos de isquemia aguda y posterior reperusión (Nagasawa *et al.* 1994). Esta combinación demuestra un déficit funcional colinérgico que debería explicar, al menos en parte, los problemas cognoscitivos detectados en los animales que sufren la lesión excitotóxica en el MS (Leutgeb *et al.* 1999).

El aumento en los lugares de unión al receptor GABA_A en todos los estratos del CA3 y el *hilus* de la circunvolución dentada demuestran que el sistema GABAérgico hipocampal se ve afectado tras la lesión excitotóxica en el MS. De hecho las neuronas GABAérgicas de la vía SH se ven disminuidas en gran medida tras la lesión (ver sección 4.1) pero éstas parecen no ser lo suficientemente importantes en número, entre el 10 y el 30% del total de neuronas de la vía (Kiss *et al.* 1990a), para que su pérdida explique totalmente esta adaptación. Por otro lado, las interneuronas hipocampales, en su gran mayoría GABAérgicas (Freund *et al.* 1996), tienen receptores M₁ mediante los cuales son excitadas por la acetilcolina para modular la actividad de las neuronas piramidales del CA1 (Buzsáqui 1984, Freund *et al.* 1996). Así pues, la pérdida colinérgica creada por la lesión del MS podría traducirse en un déficit

GABAérgico que indujera a la activación de los mecanismos de plasticidad sináptica mediante el aumento de la expresión de los receptores GABA_A.

El mantenimiento de los lugares de unión al receptor NMDA en el hipocampo tras la lesión excitotóxica en el MS correlaciona con la falta de variaciones de esta proteína que se detectó por *immunoblot* un mes tras la lesión de la fimbria y el fórnix (Ginsberg *et al.* 1996). Sin embargo, ese mismo tipo de lesión mostró un incremento a largo plazo en lugares NMDA de unión del glutamato detectado por autorradiografía *in vitro* utilizando aminoácidos excitadores como ligando (Geddes *et al.* 1992, Lhatinen *et al.* 1993). En primer lugar, esos estudios diferenciaban entre lugares de unión de kainato y Glu, pero no podían diferenciar entre los tipos de receptores. Aunque estas disparidades también podrían implicar diferencias en la afinidad del receptor por el ligando debidas a la lesión. Sea como fuere, parece ser que la lesión excitotóxica en el MS tiene unos efectos en la transmisión glutamatérgica hipocampal diferentes los a los que aparecen tras una axotomía, pese a que los procesos celulares que desencadenan a corto plazo en el MS sean similares (Ginsberg *et al.* 1999).

En conclusión, la inyección de 0,5 µL de AMPA 5,4 mM en el MS no parece provocar ningún proceso neurodegenerativo en el hipocampo, puesto que no se observa pérdida neuronal, atrofia del área, ni reacción glial de ningún tipo en esta estructura. Sin embargo sí que se observa la reducción de la actividad AChE en el CA3 hipocampal y un aumento de los receptores presinápticos GABA_A en esta misma estructura y en el *hilus* de la circunvolución dentada. Por su parte, el número de receptores NMDA no varía en todo el complejo hipocampal. Queda por demostrar si la pérdida colinérgica fruto de la lesión excitotóxica del MS provoca una reducción de la transmisión GABAérgica en el hipocampo.

4.4

Estudio *in vivo* de los cambios inducidos por la lesión septal en la actividad glutamatérgica hipocampal y en su modulación por los sistemas de inhibición

4. 4:

ESTUDIO *IN VIVO* DE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA LESIÓN SEPTAL EN LA ACTIVIDAD GLUTAMATÉRGICA HIPOCAMPAL Y EN SU MODULACIÓN POR LOS SISTEMAS DE INHIBICIÓN

INTRODUCCIÓN

Se considera un hecho la participación del hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria (Vanderwolf *et al.* 1994) y también se ha demostrado que el complejo MS-DBB tiene un papel importante en estos procesos, al menos por lo que respecta a sus proyecciones hacia la formación hipocampal (Barnes 1988, Squire 1992). Sin embargo, la hipótesis de la pérdida colinérgica se muestra insuficiente para explicar los déficits cognoscitivos que aparecen asociados a la lesión excitotóxica en el MS (Leutgeb *et al.* 1999, McAlonan *et al.* 1995) por lo que parece necesario considerar la participación de otros neurotransmisores. A este respecto, los EAA y en particular el Glu se muestran de especial relevancia debido a su posible toxicidad y dado su papel en los procesos de LTP en el hipocampo (Collingridge *et al.* 1987, Morris *et al.* 1986); además algunos estudios en modelos animales apuntan a cambios específicos del sistema glutamatérgico hipocampal. Así, los lugares de unión al receptor AMPA en el hipocampo de ratas viejas con problemas de memoria se encuentran aumentados (Le Jeune *et al.* 1996) y el sistema de recaptación del Glu ve disminuida su actividad en el hipocampo de ratas que han sufrido una lesión de la fimbria y el fórnix (Ginsberg *et al.* 1996). Sin embargo a día de hoy, no hay estudios acerca de los efectos que tiene la lesión excitotóxica en el MS sobre la neurotransmisión glutamatérgica en el hipocampo.

Las células GABAérgicas del complejo MS-DBB participan en las disfunciones cognoscitivas asociadas a la lesión excitotóxica del MS (McAlonan *et al.* 1995). Aunque se sabe muy poco sobre los efectos de la lesión del MS en los niveles de neurotransmisores inhibidores como el GABA o la adenosina ambos neurotransmisores son liberados durante la excitotoxicidad (Pedata *et al.* 1993, Phillis *et al.* 1994, Saransaari *et al.* 1997), existiendo muchos datos que

muestran el papel modulador de esas moléculas en el grado de muerte celular asociado con la excitotoxicidad en el hipocampo (Rudolph *et al.* 1992, Saransaari *et al.* 1997).

Por otro lado, la adenosina en el SNC es una molécula liberada por las neuronas y las células gliales o generada por hidrólisis extracelular de ATP (Dunwiddie *et al.* 1997a) con una importante función neuromoduladora. En el cerebro, la adenosina ejerce su función mediante la activación de tres tipos de receptores, los A₁, los A₂ y los A₃, los cuales ejercen funciones opuestas: los receptores A₁ median el incremento en la concentración citosólica del nucleótido adenosina monofosfato 3',5'-cíclico, mientras que los A₂ y los A₃ parecen disminuir esta concentración intracelular (Dunwiddie *et al.* 1997b, van Galen *et al.* 1992). Entre los múltiples mecanismos mediante los que la adenosina ejerce su acción en el SNC se cuentan la inhibición de la liberación de neurotransmisores y la hiperpolarización de la membrana postsináptica (Dunwiddie 1985). Estos efectos inhibidores son especialmente importantes en el hipocampo donde puede llegar a inhibir la liberación de Glu en un 95 % (Dunwiddie *et al.* 1980, Lupica *et al.* 1992), a la vez que disminuye la excitabilidad postsináptica (Greene *et al.* 1985). No obstante, a través de los receptores A₂ y A₃ también potencia la liberación de Glu provocada en secciones hipocampales (Caciagli *et al.* 1995) e incrementa la excitabilidad neuronal en esta estructura. Así pues, la adenosina puede modular en el hipocampo la excitotoxicidad y los procesos de memoria a través de sus efectos sobre los niveles de Glu y/o acetilcolina. La transmisión GABAérgica, empero, no se ve afectada por este modulador (Lambert *et al.* 1991, Yoon *et al.* 1991).

En vista del control de las neuronas del MS sobre la actividad hipocampal y los efectos moduladores de la adenosina en la neurotransmisión de los EAA, nos propusimos investigar por microdiálisis intracerebral los efectos que produce la lesión excitotóxica del MS a largo plazo tanto en los niveles extracelulares basales de aminoácidos y purinas hipocampales como en la liberación de estos neurotransmisores inducida por la perfusión con altas concentraciones de potasio. Además, nos propusimos evaluar la función de los receptores presinápticos A₁ en los mecanismos de inhibición posiblemente activados en el hipocampo tras la lesión, con el bloqueo del receptor A₁ mediante la

administración a través de la fibra de diálisis de un antagonista específico en condiciones de saturación, DPCPX 0,1 μM (Haleen *et al.* 1987, Lee *et al.* 1986 Lucchi *et al.* 1996).

METODOLOGÍA UTILIZADA

El experimento se realizó con treinta y seis animales. Mediante estereotaxia, se microinyectaron 0,5 μL de AMPA 5,4 mM ($n = 24$) o de PBS 50 mM ($n = 6$) en el septo medio, se utilizaron seis ratas más sin ninguna manipulación como grupo control.

Microdiálisis intracerebral *in vivo*

Las experiencias de microdiálisis intracerebral *in vivo* en el hipocampo se realizaron sesenta días después de la lesión estereotóxica, siguiendo cinco etapas diferentes de perfusión y recogiendo muestras cada 20 minutos: 1) Para estimar los valores basales se recogían cuatro muestras de dializado (80 minutos) perfundiendo al animal con LCR artificial; 2) para estimar los valores durante la despolarización de las neuronas, perfusión durante cuarenta minutos con altos niveles de potasio (LCR con KCl 100 mM); 3) después de ello se volvía al LCR artificial por espacio de ciento cuarenta minutos; 4) de nuevo altos niveles de K^+ durante cuarenta minutos; y 5) se volvía al LCR durante las últimas tres horas.

Las ratas fueron divididas en dos grupos, para poder estudiar los efectos de la regulación ejercida por el receptor A_1 de la adenosina sobre la actividad glutamatérgica. A la mitad de las ratas (tres control, tres operadas con PBS y seis operadas con AMPA) se las sometió al protocolo arriba explicado; mientras que para la otra mitad se modificó el protocolo y, durante los últimos cuarenta minutos de la etapa 3, recibieron la infusión de LCR que contenía DPCPX 0,1 μM .

El contenido de aminoácidos en las muestras de dializado se analizó por HPLC con detección de fluorescencia tras la derivatización con OPA, mientras que el contenido de purinas se estimó directamente con detección de ultravioleta. El valor resultante se corrigió en función del porcentaje de captación *in vitro* que se había calculado para cada molécula (ver *Materiales y Metodología General*).

Análisis histológico

La correcta localización de la inyección y del implante de la fibra de diálisis se comprobó histológicamente en cortes coronales de las zonas de interés teñidas con violeta de cresilo.

Cinco de los animales operados con AMPA y cuatro de los controles fueron escogidos al azar para comprobar la eficacia de la lesión. Estos animales al día siguiente de ser sometidos a la microdiálisis intracerebral, fueron anestesiados y perfundidos con fijador. Inmediatamente después se extrajo el cerebro, el cual, tras crioprotección con sacarosa al 15 % (p/v), fue congelado con nieve carbónica.

Con el criostato se obtuvieron cortes coronales seriados de 12 μm de grosor al nivel del lugar de inyección +0,7 rostral a *bregma* -siempre según el atlas de Paxinos *et al.* (1986)-. Sobre esos cortes se realizaron las siguientes experiencias:

- ☞ Tinción inmunohistoquímica de la ChAT.
- ☞ Tinción inmunohistoquímica de la parvalbúmina.

La muerte neuronal en el septo medio se calculó con el recuento de neuronas al microscopio óptico a 100 aumentos. Se contó el número de neuronas ChAT y parvalbúmina inmunopositivas, y el factor de corrección de Floderus ascendía a 0,86 (ver *Materiales y Metodología General*).

Análisis estadístico

Tras realizar la prueba de Mann-Witney se encontró que los resultados de las ratas inyectadas con vehículo y las controles no diferían por lo que sus valores fueron agrupados en un único grupo control. Para cada variable, los valores de ese grupo se compararon con los de las ratas perfundidas con DPCPX o las lesionadas con AMPA por medio de la prueba no paramétrica de Friedman para medidas repetidas. Cuando se encontraron diferencias, los parámetros de un mismo individuo se estudiaron con la prueba de Wilcoxon tras verificar que el emparejamiento era efectivo, cosa que se hizo calculando la correlación no paramétrica de Spearman. Si el emparejamiento no era efectivo o las muestras eran de diferentes individuos se realizó la prueba de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Estimación de la lesión

La inyección de AMPA en el MS produjo una pérdida del $70 \pm 4 \%$ en el número de neuronas inmunopositivas para la ChAT ($U = 21.30$, $p < 0.01$) y una reducción del $54 \pm 6 \%$ ($U = 20.8$, $p < 0.01$) en el número de células inmunopositivas para la parvalbúmina.

Niveles extracelulares de aminoácidos en el hipocampo

Los niveles extracelulares de los aminoácidos hipocampales encontrados en las ratas control y en las que sufrieron una lesión excitotóxica septal están expresados en la tabla 4.4.1. Los valores basales representan la media de las cuatro primeras muestras previas a la estimulación con potasio, después de haberse alcanzado unas condiciones estables.

☞ *El aspartato.* En todos los supuestos estudiados los niveles basales de Asp extracelular se mantuvieron invariables ($Fr = 5.0$, $p = 0.19$); así, ni la lesión septal, ni el tratamiento farmacológico con DPCPX provocaron cambios en la concentración extracelular de Asp en el hipocampo (tabla 4.4.1). Sin embargo, la perfusión con KCl 100 mM produjo un aumento significativo en la concentración extracelular de Asp, tanto en las ratas control ($Fr = 12.6$, $p = 0.0006$) donde llegaba al 379% respecto a los niveles basales, como en las lesionadas ($Fr = 12.6$, $p = 0.0006$) aumentando un 433% respecto a la perfusión con LCR. En cualquier caso los niveles basales se recuperaban rápidamente (figura 4.4.1). Ni la lesión, ni el tratamiento farmacológico, ni la combinación de ambas cosas modificaron la liberación inducida por potasio pues la concentración extracelular de Asp alcanzaba valores similares en cualquiera de los casos ($Fr = 3.4$, $p = 0.37$).

☞ *El Glutamato.* Se han encontrado variaciones en los niveles extracelulares de Glu en el hipocampo ($Fr = 7,8$, $p = 0,044$) (tabla 4.4.1, figura 4.4.1). La lesión excitotóxica en el MS disminuyó significativamente los niveles basales extracelulares de Glu hipocampal ($U = 22$, $p = 0,03$) en un 27%. El DPCPX en las

ratas control provocó un aumento significativo del 75% respecto a los niveles basales ($U = 24$, $p = 0,015$) y lo mismo ocurrió en las ratas lesionadas ($U = 23$, $p = 0,031$) donde el aumento alcanzó el 95%. Además, cabe resaltar que la infusión de DPCPX aumentó la concentración extracelular de Glu en las ratas lesionadas hasta el nivel que lo hizo en el grupo control ($U = 13$, $p = 0,91$).

La perfusión de altas concentraciones de K^+ produjo un incremento significativo en la concentración extracelular de Glu, tanto en las ratas control ($Fr = 15,3$, $p = 0,0016$) donde llegaba al 407% respecto a los niveles basales, como en las lesionadas ($Fr = 13,5$, $p = 0,0001$), aumentando en este grupo un 575% respecto a la perfusión con LCR (figura 4.4.1) y llegando a niveles similares a los de las ratas control ($Kr = 6,12$, $p = 0,12$). La recuperación de los niveles basales era siempre rápida y similar excepto en las ratas lesionadas tras recibir la perfusión de DPCPX, en cuyo caso la concentración extracelular de Glu tardaba en volver a los niveles basales 20 minutos más que en los otros supuestos ($U = 35$, $p = 0,015$).

☞ *La glutamina.* Se han encontrado variaciones de los niveles basales extracelulares de Gln ($Fr = 10,9$, $p = 0,003$) (tabla 4.4.1, figura 4.4.1). Así, la inyección de AMPA en el MS disminuía significativamente ($U = 16$, $p = 0,015$) los niveles extracelulares de Gln hipocampal en un 47 %. El tratamiento con DPCPX aumentó significativamente ($U = 78$, $p = 0,0079$) los valores de Gln extracelular en un 54% en las ratas control, mientras que en las ratas lesionadas este incremento alcanzaba el 145% ($U = 35$, $p = 0,015$). Además, el DPCPX aplicado a las ratas control y a las lesionadas llevaba la Gln a los mismos niveles de concentración ($U = 20$, $p = 0,15$).

La perfusión de KCl 100 mM produjo un aumento significativo en la Gln extracelular, tanto en las ratas control ($Fr = 39$, $p = 0,0006$) donde llegaba al 407% respecto a los niveles basales, como en las lesionadas ($Fr = 15,3$, $p = 0,0016$). En cualquiera de los casos, la Gln extracelular llegaba a niveles similares ($Fr = 2,52$, $p = 0,52$).

☞ *Tasa de recambio del glutamato.* La Gln es la vía de eliminación del Glu por parte de los astrocitos, por lo que sí la relación Gln/Glu cambiase indicaría

una variación en el recambio del neurotransmisor. No se observaron variaciones en la proporción Gln/Glu en ninguno de los supuestos estudiados (figura 4.4.2), por lo que ni la lesión, ni el DPCPX afectaron a la tasa de recambio ($Fr = 3.24$, $p = 0.41$) y tampoco lo hizo la perfusión con KCl ($Fr = 1.08$, $p = 0.85$ en el grupo control y $Fr = 4.92$, $p = 0.21$ en las ratas lesionadas).

Tabla 4.5.1: Niveles hipocampales de aminoácidos en función de la composición del líquido de perfusión.

Aminoácido	Tratamiento	LCR artificial	KCl 100 mM	DPCPX 0,1 μ M	KCl 100 mM
Asp	Control	1,5 \pm 0,1	5,1 \pm 0,8***	0,71 \pm 0,1	5,6 \pm 0,7***
	AMPA	1,4 \pm 0,1	5,4 \pm 0,7***	1,2 \pm 0,1	7,6 \pm 1,5***
Glu	control	13,9 \pm 1,6	63,6 \pm 10,7**	23,4 \pm 3,7*	68,7 \pm 19,2**
	AMPA	9,8 \pm 1,08 [#]	41,9 \pm 6,7**	25,6 \pm 4,4*	108,5 \pm 28,6**
Gln	control	44,8 \pm 2,8	184,9 \pm 16***	73,5 \pm 8,1**	163,1 \pm 6,3***
	AMPA	29,4 \pm 4,2 [#]	155,9 \pm 12***	69,6 \pm 8,3*	169,1 \pm 16***
Ser	control	2,06 \pm 0,4	2,1 \pm 0,5	2,5 \pm 0,4	2,0 \pm 0,3
	AMPA	2,2 \pm 0,2	2,1 \pm 0,4	2,16 \pm 0,5	2,1 \pm 0,3
Gly	control	9,5 \pm 0,5	43,7 \pm 9,1**	8,5 \pm 0,9	35,6 \pm 9,2**
	AMPA	8,8 \pm 0,7	34,6 \pm 6,1**	8,1 \pm 0,4	36,7 \pm 5,9**
Tau	control	9,5 \pm 1,6	27,85 \pm 8,1**	12,6 \pm 3,4	24,4 \pm 6,3**
	AMPA	13,93 \pm 1,13 ^{##}	28,21 \pm 3,9**	9,09 \pm 1,39 ^{##}	19,6 \pm 3,5**
GABA	control	0,98 \pm 0,16	6,24 \pm 1,26***	1,39 \pm 0,36*	5,02 \pm 0,98***
	AMPA	0,56 \pm 0,07 ^{##}	3,50 \pm 0,50 ^{##}	1,26 \pm 0,19*	4,03 \pm 0,75 ^{##}

Los valores corresponden a la media \pm SEM, expresados en concentración (μ M) y ajustados para la recuperación de la fibra. El valor indicado con la administración de KCl 100 mM es la concentración máxima alcanzada. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$ respecto a LCR. #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$ respecto al control.

☞ *La serina.* La concentración extracelular de Ser se mantuvo al mismo nivel en todas las ratas y ni la lesión ni la infusión con DPCPX produjeron ningún efecto ($Fr = 0,36$, $p = 0,97$) como tampoco lo hizo la perfusión de LCR artificial que contenía KCl ($Fr = 0,65$, $p = 0,85$) (tabla 4.4.1).

4.4: Efectos en los aminoácidos y las purinas hipocampales

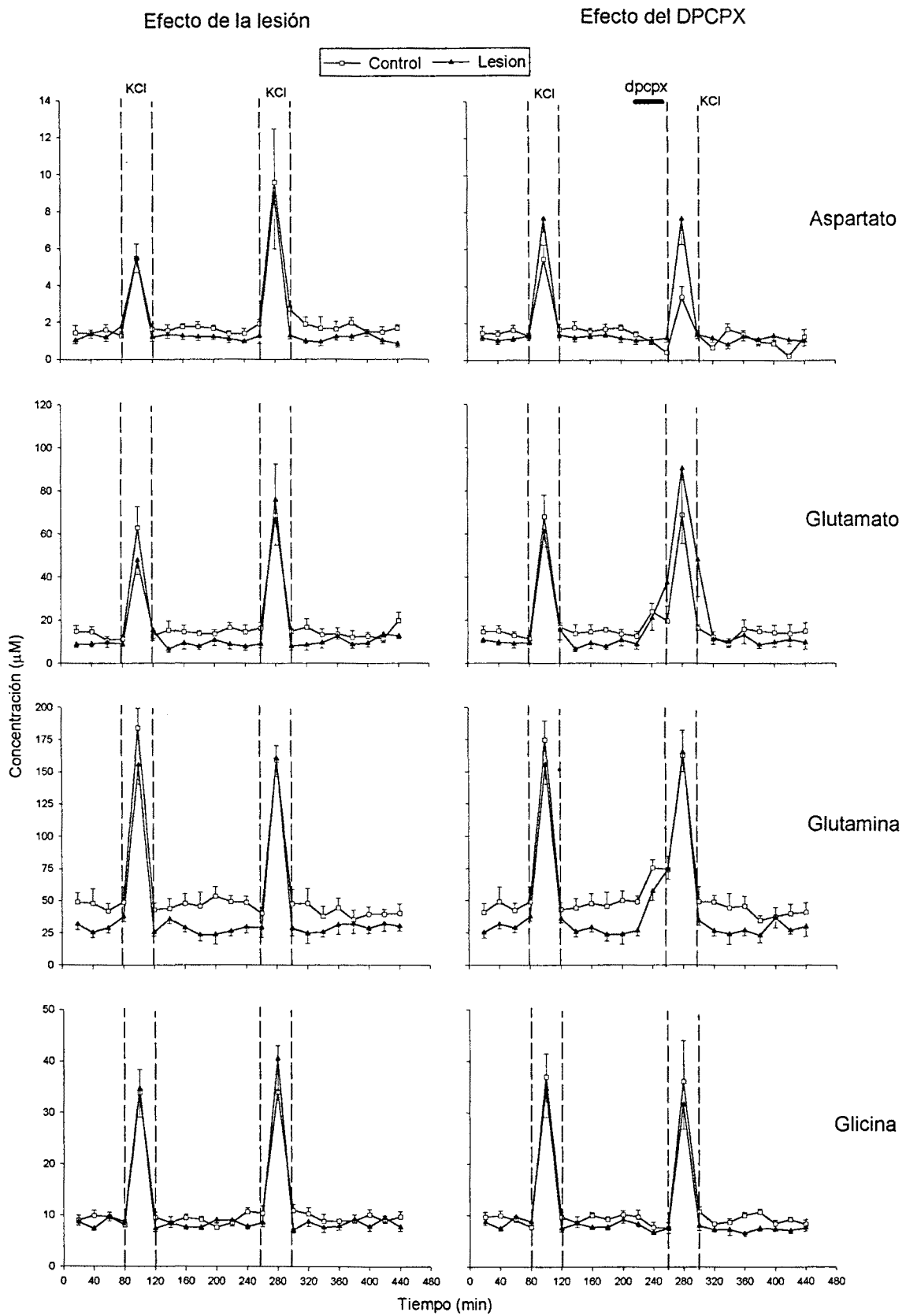


Figura 4.5.1a: Concentración extracelular de Asp, Glu, Gln y Gly en el hipocampo de ratas despiertas con libertad de movimientos. Entre las líneas punteadas aparecen los periodos de administración de KCl 100 mM a través de la fibra de diálisis y la barra horizontal muestra la administración de DPCPX. Cada punto representa la media \pm SEM

4.4: Efectos en los aminoácidos y las purinas hipocampales

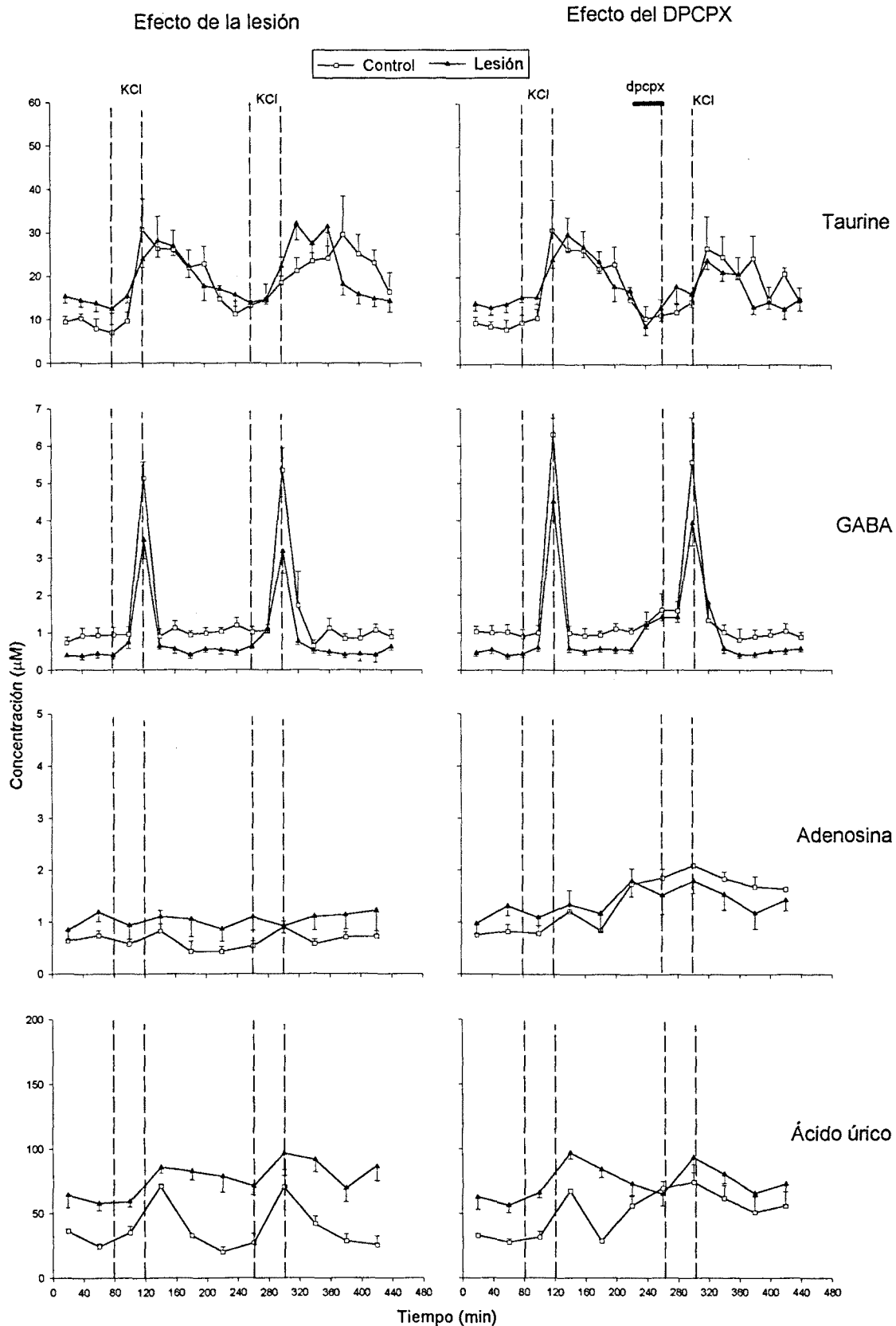


Figura 4.5.1b: Concentración extracelular de Tau, GABA, adenosina y ácido úrico en el hipocampo de ratas despiertas con libertad de movimientos. Entre las líneas punteadas aparecen los periodos de administración de KCl 100 mM a través de la fibra de diálisis y la barra horizontal muestra la administración de DPCPX. Cada punto representa la media \pm SEM

☞ *La glicina.* Los niveles extracelulares basales eran iguales en todos los casos ($Fr = 3,48$, $p = 0,37$) (tabla 4.4.1, figura 4.4.1). La lesión en el MS no provocó cambios en su concentración y el DPCPX tampoco, ni en las ratas control ni en las lesionadas. Sin embargo, el K^+ produjo un aumento significativo en la concentración extracelular de Gly, tanto en las ratas control ($Fr = 12,12$ $p = 0,0014$) donde llegaba al 382% respecto a los niveles basales, como en las lesionadas ($Fr = 13,8$, $p = 0,0002$) aumentando un 356% respecto a la perfusión con LCR. En ambos casos, la Gly extracelular alcanzaba concentraciones similares al perfundir con K^+ ($Fr = 2,52$, $p = 0,52$) y los niveles basales se recuperaban inmediatamente después de alcanzar el valor máximo.

☞ *La taurina.* Se detectaron variaciones de los niveles basales extracelulares de Tau en el hipocampo ($Fr = 7,8$, $p = 0,043$) (tabla 4.4.1, figura 4.4.1). La lesión aumentaba significativamente la concentración extracelular de Tau en un 51% ($U = 24$, $p = 0,0079$). En las ratas control, el tratamiento con DPCPX no variaba significativamente estos niveles ($U = 18$, $p = 0,065$) pero en las ratas lesionadas disminuían un 36% ($U = 25$, $p = 0,0079$). Además, el DPCPX aplicado a las ratas lesionadas llevaba la Tau a los mismos niveles basales detectados en las ratas control ($U = 13$, $p = 0,97$).

Al perfundir con KCl 100 mM se produjo un incremento significativo en la concentración extracelular de Tau, tanto en las ratas control ($Fr = 10,6$ $p = 0,0055$) donde llegaba al 210% respecto a los niveles basales, como en las lesionadas ($Fr = 12,8$, $p = 0,0003$) aumentando un 118% respecto a la perfusión con LCR. Sin embargo, este aumento de la concentración extracelular de Tau se encontraba retardado 20 minutos respecto al momento de la infusión de la sal, manteniéndose altos los niveles durante más de dos horas (figura 4.4.1). No se encontraron diferencias en esta liberación entre los diferentes grupos animales, pues en todos los casos la Tau extracelular alcanzaba concentraciones similares ($Fr = 3,24$, $p = 0,4$).

☞ *El ácido γ -aminobutírico.* Se encontraron variaciones de los niveles basales de GABA en el hipocampo ($Fr = 7,8$, $p = 0,043$) (tabla 4.4.1, figura 4.4.1). Se encontró que la lesión disminuía significativamente los niveles de GABA en

un 53% ($U = 94$, $p = 0,0024$). Además, en las ratas del grupo control, el tratamiento con DPCPX no variaba significativamente la concentración del neurotransmisor, ($U = 15$, $p = 0,69$) pero en las ratas lesionadas en el MS los niveles del neurotransmisor aumentaban un 142% ($U = 74,5$, $p = 0,0024$).

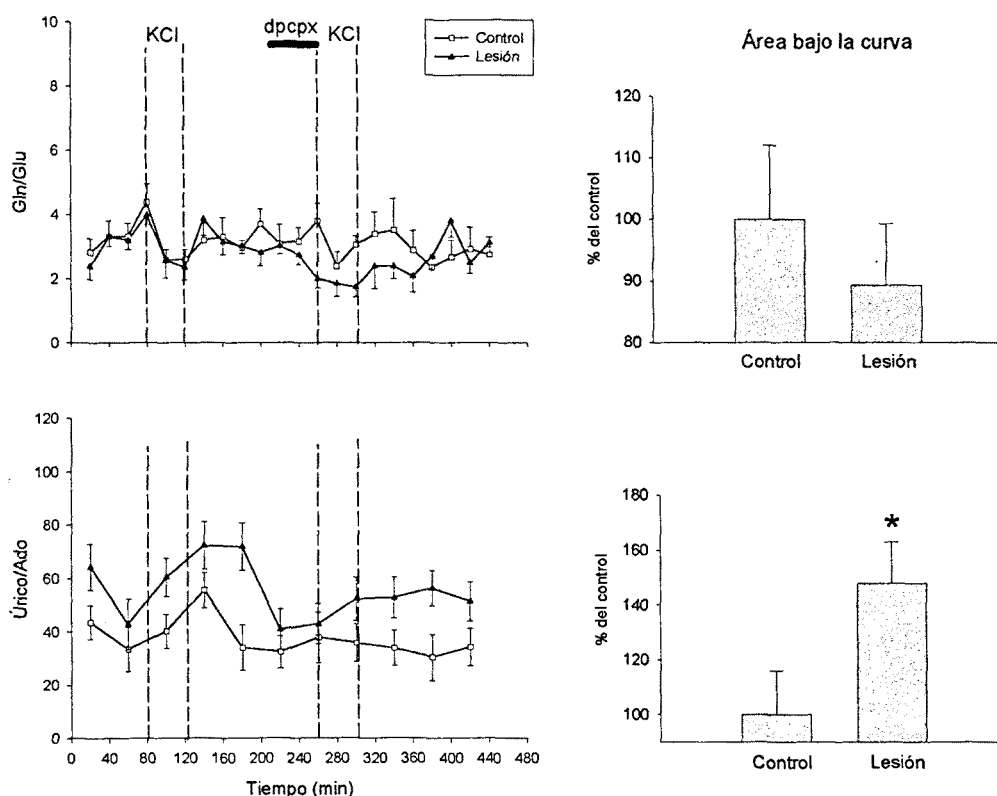


Figura 4.5.2: Cociente Gln/Glu y ácido úrico/adenosina como estimación de la tasa de recambio de ambos neurotransmisores. Entre las líneas punteadas aparecen los periodos de administración de KCl 100 mM a través de la fibra de diálisis y la barra horizontal muestra el periodo de administración de DPCPX. Al calcular el área bajo las curvas, sólo en la relación úrico/adenosina se encontró un cambio significativo ($U = 17$, $p = 0,035$)

El K^+ en el líquido de perfusión produjo un aumento significativo en la concentración de GABA, tanto en las ratas control ($Fr = 12,12$ $p = 0,0014$) donde llegaba al 310% respecto a los niveles basales, como en las lesionadas ($Fr = 13,7$, $p = 0,0001$) aumentando un 806% respecto a la perfusión con LCR. Como en el caso de la taurina, este aumento en la concentración extracelular de GABA se encontraba retardado 20 minutos respecto al momento de la infusión del KCl, pero en este caso los niveles basales se recuperaban rápidamente en todos los casos. Además, tras la perfusión con K^+ y al compararse con los niveles

alcanzados en el grupo control, el GABA extracelular alcanzaba concentraciones menores en las ratas lesionadas (Fr = 10,68, p = 0,005).

Niveles extracelulares de purinas en el hipocampo

Los niveles extracelulares de purinas encontrados en el hipocampo en las ratas control y en las que recibieron una inyección de 0,5 μ L de AMPA 5,4 mM están expresados en la tabla 4.4.2. Los valores basales representan la media de las cuatro primeras muestras previas a la estimulación con potasio, después de haberse alcanzado unas condiciones estables. Tanto la inosina como la hipoxantina mostraron valores muy cercanos al límite de detección, por lo que en algunos supuestos nos fue imposible establecer la concentración de los metabolitos en el espacio extracelular del hipocampo. De todas formas, cuando pudieron ser detectados, sus valores fueron similares en todos los grupos.

☞ *La adenosina.* Se observaron cambios en los niveles basales de adenosina hipocampal (Fr = 8,1, p = 0,03) (tabla 4.4.2, figura 4.4.1). La lesión del SM provocaba un incremento significativo del 71% en los niveles basales de adenosina hipocampal (U = 18, p = 0,04). Por otro lado, en el grupo control, la adenosina extracelular aumentaba significativamente (U = 16, p = 0,028) un 154% tras la inclusión de DPCPX en el medio de perfusión, cosa que no ocurría en el grupo de ratas lesionadas. (U = 12, p = 0,34). Este incremento en el contenido de adenosina en el medio extracelular se mantenía durante el resto del experimento. Finalmente, el KCl 100 mM produjo un aumento en la concentración de adenosina en las ratas control que no alcanzó la significación estadística (Fr = 6, p = 0,12) y que no se observó en las lesionadas (Fr = 2,7, p = 0,34).

☞ *El ácido úrico.* Se encontraron variaciones de los niveles basales de ácido úrico en el hipocampo (Fr = 8,4, p = 0,014) (tabla 4.5.2, figura 4.5.1). La lesión en el SM incrementaba significativamente los niveles basales de ácido úrico en un 71% (U = 16, p = 0,028). En las ratas control el ácido úrico extracelular aumentaba significativamente (U = 16, p = 0,028) un 58% tras el tratamiento con DPCPX, cosa que no ocurría con las lesionadas. (U = 12, p = 0,34).

El KCl 100 mM produjo un aumento significativo en la concentración de ácido úrico en las ratas control (Fr = 8,4 p = 0,014) donde llegaba al 99 % respecto a los niveles basales, pero no en las lesionadas (Fr = 2,7, p = 0,50). Además, los niveles alcanzados en el grupo control tras el tratamiento con DPCPX no eran distintos de los alcanzados tras la infusión de KCl (U = 11, p = 0,48) y de los que presentaban las ratas lesionadas en el MS (U = 40, p = 0,14).

Tabla 4.5.2: Niveles hipocampales de purinas en función de la composición del líquido de perfusión.

	Tratamiento	LCR artificial	KCl 100 mM	DPCPX 0,1 μ M	KCl 100 mM
Adenosina	control	0,68 \pm 0,07	1,15 \pm 0,2	1,73 \pm 0,3*	2,09 \pm 0,1*
	AMPA	1,09 \pm 0,07 [#]	1,18 \pm 0,1	1,68 \pm 0,3	1,79 \pm 0,3
Ácido úrico	Control	35,3 \pm 3,2	70,5 \pm 5,3	56,0 \pm 7,2*	56,9 \pm 4,1
	AMPA	64,7 \pm 4,8 [#]	93,2 \pm 6,6	73,1 \pm 8,9	92,5 \pm 11,6
Inosina	control	ND	ND	0,66 \pm 0,38	0,86 \pm 0,33
	AMPA	0,32 \pm 0,06	0,29 \pm 0,14	0,42 \pm 0,12	0,51 \pm 0,23
Hipoxantina	control	0,17 \pm 0,07	0,10 \pm 0,05	0,30 \pm 0,14	0,29 \pm 0,10
	AMPA	0,12 \pm 0,03	0,29 \pm 0,14	ND	0,21 \pm 0,15

Los valores corresponden a la media \pm SEM, expresados en concentración (μ M) y ajustados para la recuperación de la fibra. El valor indicado con la administración de KCl 100 mM es la concentración máxima alcanzada. *, p < 0,05 respecto a LCR. #, p < 0,05 respecto al control.

☞ *La relación ácido úrico / adenosina:* No se observaron variaciones en la relación ácido úrico / adenosina en ninguno de los supuestos. Ni la lesión ni el DPCPX modificaron esta relación (Fr = 5,8, = 0,14) y tampoco la perfusión inducida con KCl (Fr = 5, p = 0,20 en las ratas control y Fr = 4,92, p = 0,21 en las lesionadas) Sin embargo, al calcular el área bajo la curva (figura 4.4.2) se encontró un aumento significativo (U = 17, p = 0,035) del 43% en este cociente.

DISCUSIÓN

Los niveles basales

La concentración extracelular de los diferentes aminoácidos estudiados es similar a la descrita por otros autores en condiciones experimentales parecidas,

tanto en el hipocampo de la rata (Benveniste *et al.* 1984, Britton *et al.* 1996), como en el de conejo (Lehman *et al.* 1983). Por otro lado, los niveles de adenosina extracelular en el cerebro de rata presenta variaciones importantes con valores comprendidos entre 40 nM y 2 μ M (Ballarín *et al.* 1991b, Kaku *et al.* 1994, Pazzagli *et al.* 1994). La concentración extracelular hipocampal de adenosina y sus metabolitos aquí encontrada cae entre los valores estimados en otros trabajos (Ballarín *et al.* 1987, Kaku *et al.* 1994, Kim *et al.* 1994, O'Neill *et al.* 1991).

Respecto al aumento de concentración de todas las moléculas estudiadas inducido por potasio, la respuesta de todos los sistemas es similar a la descrita en la literatura (Ballarín *et al.* 1987, Benveniste *et al.* 1984, Britton *et al.* 1996, Kaku *et al.* 1994). Sin embargo, cabe resaltar dos hechos: En primer lugar, el aumento de concentración de la adenosina inducida por potasio no llega a alcanzar la significación estadística, lo que claramente contrasta con otros autores que sí han visto ese efecto en el hipocampo y la corteza cerebral (Pazzagli *et al.* 1994). En esos trabajos las concentraciones extracelulares de adenosina, hipoxantina e inosina en el hipocampo aumentaban entre 2 y 5 veces respecto a los niveles basales, recuperándose la concentración basal en un corto espacio de tiempo (20 minutos). Debido al pequeño aumento de concentración causado por la perfusión con KCl 100 mM y a que nosotros recogimos las muestras cada 40 minutos, es posible que existiera un efecto de dilución de la muestra y por ello el incremento quede amortiguado y no alcance la significación estadística. De todas formas, tras la despolarización inducida por potasio, sí que encontramos un aumento importante de los niveles de ácido úrico, el producto final de la degradación de la adenosina, y una tendencia a incrementar la tasa de recambio de estas dos moléculas por lo que se puede inferir una respuesta funcional de la adenosina tras la despolarización inducida por potasio.

El otro hecho a tener en cuenta consiste en que, mientras que el resto de moléculas ve como se restablecen rápidamente sus concentraciones basales, el aumento de concentración experimentado por la Tau se mantiene al menos dos horas. La Tau es una molécula sintetizada por los astrocitos y, aunque se le atribuye una función neuromoduladora, actúa también como osmoregulador y antioxidante (ver revisión de Huxtable 1994), El hecho de que sea liberada y esté

tanto tiempo en el espacio extracelular tras la perfusión con altas concentraciones de K^+ abunda en este papel osmoregulador (Bruhn *et al.* 1996, Huxtable 1992, Schousboe *et al.* 1989)

Efectos de la lesión septal

Dos meses tras la lesión excitotóxica en el MS no se observaron cambios significativos en la concentración basal extracelular de Asp, Gly y Ser. Sin embargo, los niveles de Glu, Gln, y GABA se encontraron sensiblemente disminuidos, mientras que los de adenosina, ácido úrico y Tau aumentaban significativamente. Estas modificaciones contrastan con los efectos asociados al daño cerebral causado más a corto plazo, como el observado tras la isquemia cerebral. En esta situación, se ha demostrado un incremento de la concentración extracelular de Asp, Glu y Tau en el hipocampo (Benveniste *et al.* 1984) y la corteza cerebral. En este último núcleo, además, el incremento parece estar mediado por la acción de la adenosina (Simpson *et al.* 1992).

Tanto las neuronas colinérgicas como GABAérgicas de la vía SH participan del control de la actividad de las interneuronas GABAérgicas hipocampales (Buzsaki 1984, Freund *et al.* 1988, Stewart *et al.* 1987) (figura 4.4.3). Por ello, la disminución de los niveles basales de GABA observada en el hipocampo de las ratas lesionadas podría atribuirse a dos efectos diferentes, el decremento de la transmisión GABAérgica del MS y la falta de transmisión colinérgica excitadora sobre las interneuronas del hipocampo. Esto implicaría una regulación tónica por parte de la vía SH de los niveles basales de GABA en el hipocampo. Pero además, la pérdida de las aferencias de la vía SH disminuye en un 32% la liberación de GABA inducida por potasio. La lesión del MS no disminuye los niveles de acetilcolina extracelular medidos en el hipocampo pero sí destruye la respuesta de este neurotransmisor a la liberación inducida por potasio (Zapata *et al.* 2000). Dado que, en el hipocampo, las neuronas GABAérgicas tienen receptores muscarínicos sensibles a las aferencias colinérgicas (Freund *et al.* 1996), la reducción del 32% en la respuesta a la liberación mediada por potasio podría reflejar tanto la pérdida de proyecciones GABAérgicas SH como la disminución del control colinérgico y GABAérgico en el hipocampo. Por otro lado estos resultados contribuyen a explicar el aumento de

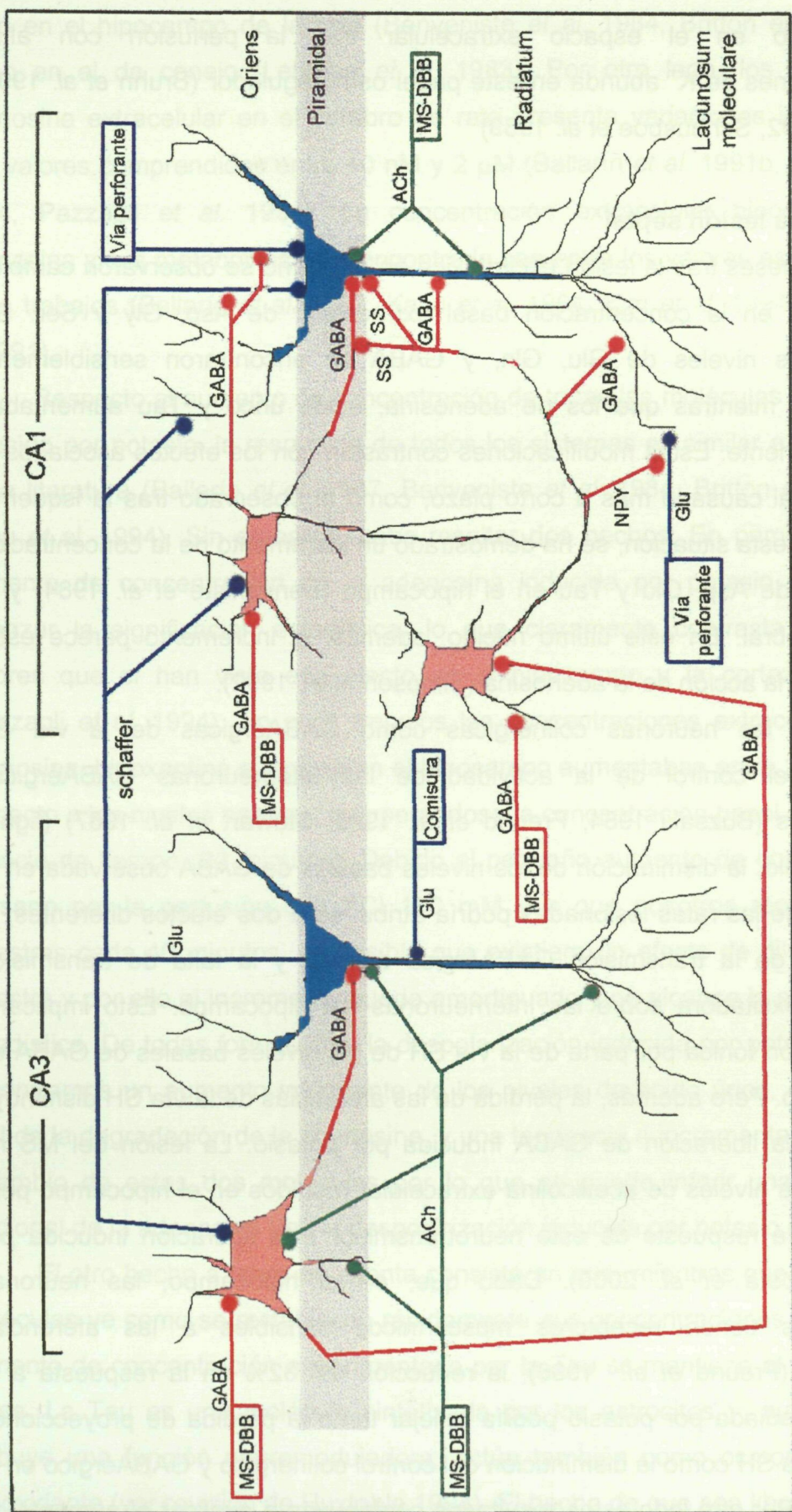


Figura 4.4.4: Dibujo esquemático del circuito neuronal entre el CA3 y el CA1. El esquema incluye las aferencias desde el complejo MS-DBB y la vía perforante desde la corteza. Para mayor claridad se han representado en rojo las conexiones inhibitorias, en azul las activadoras y en verde las colinérgicas, las cuales pueden tener diferentes efectos. ACh, acetilcolina; NPY, neuropéptido Y; SS, somatostatina. Adaptado de Freund *et al.* 1996 y Johansen *et al.* 1993.

los lugares de unión del [³H]muscimol encontrados en el CA3 del hipocampo y el *hilus* de la circunvolución dentada (sección 4.3).

Las aferencias colinérgicas septales tienen en el hipocampo efectos tanto activadores como inhibidores y desinhibidores (Freund *et al.* 1996, Johansen 1993) explicados por la interacción de la somatostatina con la acetilcolina (Johansen 1993). La somatostatina por si sola tiene un efecto inhibitor en el hipocampo pero al aplicarse junto con la acetilcolina aumenta los efectos excitadores de ésta (Moore *et al.* 1988). Así, a corto plazo, la lesión excitotóxica en el MS podría resultar en una pérdida de la excitación de las neuronas piramidales de la CA3 y, a la vez, provocar un efecto inhibitor de la somatostatina (Johansen 1993). Como resultado habría una disminución de la actividad excitadora de la CA3 lo que, tal y como se ha observado en procesos de isquemia, provocaría un incremento de la liberación de glutamato en el hipocampo (Chang *et al.* 1989).

La adenosina y la Tau son dos moléculas con actividad neuroprotectora por mediar la inhibición de la actividad glutamatérgica (Simpson *et al.* 1992, Christensen *et al.* 1991) y su liberación en el hipocampo puede estar mediada por los receptores NMDA (Chen *et al.* 1992, Manzoni *et al.* 1994, Shibanoki *et al.* 1993). Si como hemos propuesto, la lesión excitotóxica en el MS provoca un aumento inicial de la concentración extracelular de Glu, la activación de los receptores NMDA podría inducir a la liberación de estos dos moduladores para controlar los niveles de Glu y evitar un excitotóxico (Benveniste *et al.* 1984, Rudolph *et al.* 1992). Con el tiempo se obtendría un nuevo equilibrio que, como hemos descrito aquí, implicaría un aumento de la concentración extracelular de Tau y adenosina y una ligera disminución de los niveles de Glu. Esta cascada de sucesos con la aparición de los sistemas de compensación frente al daño excitotóxico explicaría que la deaferenciación de la vía SH dos semanas antes de provocar una isquemia a la rata reduzca la pérdida neuronal en el CA1 (Buchan *et al.* 1990), lo que no ocurre si la deaferenciación es inmediatamente anterior al daño isquémico (Johansen *et al.* 1993).

Junto con el aumento de la adenosina extracelular, la activación de los sistemas de compensación explicaría también el incremento de concentración extracelular de ácido úrico, puesto que esta molécula, aparte de ser un eficaz

antioxidante y preservar la actividad mitocondrial, actúa como agente protector frente al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por glutamato (Yu *et al.* 1998). Estos mecanismos de compensación parecen ser meramente presinápticos y no implicar al sistema de reciclaje del Glu por parte de la glia puesto que los niveles de Gln se encuentran también especialmente bajos en el hipocampo dos meses después de la lesión septal y la relación Gln/Glu se mantiene constante.

Por otro lado, la falta de variación de los niveles basales de Asp y Gly indican su independencia frente al control de la vía SH.

Finalmente, la liberación de los neurotransmisores excitadores inducida por potasio no se ve cuantitativamente afectada por la pérdida de aferencias septohipocampales e indica que la funcionalidad de esos sistemas parece quedar preservada tras la lesión excitotóxica septal. Este hecho contrasta con un estudio previo que describía un aumento de la liberación de Glu hipocampal inducida por KCl 100 mM tras la lesión de la fimbria y el fórnix (Herrera *et al.* 1993) y muestra una nueva diferencia entre ambos modelos de lesión.

Efectos del DPCPX

En animales control, el DPCPX aumenta los niveles basales de Glu pero no de GABA. Esto concuerda con previos estudios, los cuales demostraban que los niveles basales de adenosina pueden ser suficientes para modular la actividad excitadora en el hipocampo a través de esos receptores (Dunwiddie *et al.* 1980) y no tenían efecto sobre la GABAérgica (Dunwiddie *et al.* 1994); y con la distribución de receptores A_1 en el hipocampo, la mayoría de ellos en los axones y las dendritas de las células piramidales (Tetzlaff *et al.* 1987)

Sin embargo, la lesión del MS hace que el GABA aumente en el hipocampo tras el bloqueo de los receptores A_1 por parte del DPCPX. Como ya se refleja en la figura 4.4.4, los receptores A_1 controlan mediante una activación tónica los niveles de Glu (Dunwiddie *et al.* 1994). Al bloquear esos receptores, la concentración de Glu aumenta, lo que provocaría que la de GABA también lo hagan, puesto que ahora las células GABAérgicas ya no están controladas por la acetilcolina y su activación podría depender más directamente del glutamato. Por otro lado, la lesión septal podría también poner en evidencia un control por parte

tienen receptores glutamatérgicos y purinérgicos (A_1 y A_2) (Deitmer *et al.* 1998, Porter *et al.* 1995). Podría ser, pues, que la eliminación del Glu sináptico por parte de la glia dependiera de la acción del Glu y la adenosina y que las aferencias de la vía SH modularan esta actividad.

Por otro lado, esta posible modulación a la baja de la actividad de captación del Glu por parte de los astrocitos es consecuente con la disminución de la concentración extracelular de Gln y el mantenimiento del recambio del neurotransmisor observados en el hipocampo de las ratas lesionadas, e indicarían la activación de los mecanismos de plasticidad glial para evitar una modificación de la actividad glutamatérgica. Finalmente, la inyección sistémica de DPCPX también potencia la actividad metabólica de los astrocitos aumentando la síntesis de glucosa a partir de glutamato en detrimento de su reciclaje hasta Gln (Haberg *et al.* 2000), lo que contribuiría a explicar la disminución de Gln y el aumento de la concentración extracelular de ácido úrico encontrado tras la perfusión con DPCPX.

En resumen, este es el primer estudio en el que se demuestran variaciones en la concentración extracelular de aminoácidos y purinas hipocampales tras una lesión excitotóxica a largo plazo en el MS. La disminución significativa de la concentración extracelular de Glu, Gln y GABA asociada al aumento de Tau, adenosina y ácido úrico demuestran un importante papel de las neuronal de la vía SH en el control de la actividad hipocampal. Finalmente, la lesión excitotóxica septal evidencia en la formación hipocampal la interdependencia de los sistemas excitadores e inhibidores, con especial relevancia del control tónico ejercido por la adenosina sobre los niveles de Glu.

4.5

El incremento de receptores AMPA en el hipocampo de ratas viejas con problemas de memoria está asociado a una gliosis atípica

4.5:

EL INCREMENTO DE RECEPTORES AMPA EN EL HIPOCAMPO DE RATAS VIEJAS CON PROBLEMAS DE MEMORIA ESTÁ ASOCIADO A UNA GLIOSIS ATÍPICA

INTRODUCCIÓN

Numerosos laboratorios han demostrado la existencia de dos poblaciones de ratas viejas (de 24 a 25 meses de edad) de la cepa Long Evans que pueden ser identificadas por su comportamiento en el laberinto de agua de Morris (Issa *et al.* 1990, Le Jeune *et al.* 1996, Rowe *et al.* 1998). En esta tarea, animales viejos sin problemas de memoria (AU) rendían a niveles comparables a los jóvenes (6 meses), mientras que las ratas viejas con problemas de memoria (AI) presentaban, en el mejor de los casos, un muy limitado dominio de la tarea (Issa *et al.* 1990). Además de un déficit en las funciones colinérgicas (Quirion *et al.* 1995), recientemente se ha descrito un incremento significativo de los receptores AMPA en la mayoría de las capas hipocampales de las ratas AI frente a las AU y las jóvenes (Le Jeune *et al.* 1996). En el mismo estudio, los receptores de NMDA mostraban una ligera disminución, que no alcanzaba significación estadística, en los animales AU frente a los jóvenes, mientras que las ratas AI mostraban los mismos niveles que estos últimos.

La activación glial es un rasgo típico del cerebro envejecido, especialmente en el hipocampo (Adams *et al.* 1982). Si esta activación es beneficiosa o perjudica a la neurona es un tema de debate en la actualidad, puesto que la Astrogliosis reactiva puede contribuir a una decadencia de la función neurológica a través de mecanismos como la liberación tóxica de EAA y el estrés oxidativo (Tacconi 1998). El objetivo de este estudio era estudiar si el incremento de los receptores tipo AMPA del glutamato observado en el hipocampo de las ratas AI puede ser causado por un aumento de la astrogliosis. Para ello realizamos una cuantificación enzimática mediante autorradiografía *in vitro* en secciones coronales de cerebros de ratas AI, AU y jóvenes, utilizando un marcador de la MAO B, la [³H]lazabemide. Este marcador constituye una herramienta muy útil para el estudio de la reacción astrogliosis (Bernal *et al.* 2000b,

Petegnief *et al.* 1999, Saura *et al.* 1995). Para determinar la especificidad de esta posible relación se incluyó el septo medio en el estudio.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Estudio cognoscitivo

Los experimentos se realizaron en colaboración con el grupo de investigación del Dr. W. Quirion del *Department of Psychiatry & Douglas Hospital Res. Ctre.*, de la *McGill University* (Montreal), quienes realizaron el estudio comportamental. Se utilizaron ratas macho de la cepa Long Evans obtenidas en las granjas *Charles River Breeding* (St. Constant, Québec, Canada). Ratas viejas (24 a 25 meses de edad) y jóvenes (6 meses) fueron sometidas a la prueba del laberinto de agua de Morris tal y como se ha descrito (Issa *et al.* 1990). Cada animal era sometido a tres ensayos diarios durante cinco días. El estado cognoscitivo de los animales viejos se definió calculando el tiempo de demora en encontrar la plataforma entre los días segundo y quinto (el primer día todos los animales se demoraban lo mismo) comparándolo con la actuación de los animales jóvenes en el mismo periodo. Se consideró animales Al a aquellos cuya actuación (demora media a lo largo de los cuatro días) era mayor a 2 veces la desviación standard de los jóvenes en cada uno de los días de la experiencia. Por su parte, aquellos animales viejos cuya demora era inferior a 0,5 veces la desviación standard de la actuación de los jóvenes (figura 4.5.1). Los animales con una actuación entre 0,5 y 2 veces la desviación standard de la demora de los jóvenes no se utilizaron para pruebas posteriores.

Estudio bioquímico

Una vez aislado y congelado el cerebro de los noventa y dos animales seleccionados, se obtuvieron secciones coronales de 12 μm de grosor a los niveles de 0,2 mm rostral y 3,3 mm caudal a bregma (Paxinos *et al.* 1986). Las secciones se montaron en portas gelatinizados, se secaron con aire y almacenaron a -30°C hasta la realización de la autorradiografía *in vitro* mediante la fijación de [^3H]lazabemide.

Estudio estadístico

Los valores se expresan como la media \pm SEM. En el estudio del hipocampo la significación estadística de los cambios entre los tres grupos se estudió con la prueba del análisis de la varianza para diseño de un factor seguida por el método de comparación múltiple de Scheffé. Los posibles cambios en el septo medio se estudiaron realizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

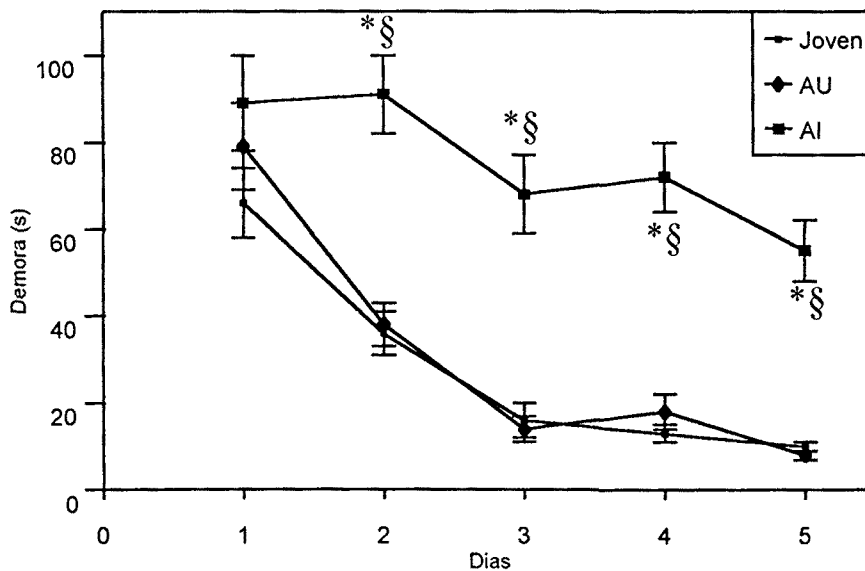


Figura 4.5.1: Actuación de las ratas jóvenes, AU y AI en el laberinto de agua de Morris. Los resultados están expresados como media \pm SEM ($n = 6$ por grupo) de la demora en encontrar la plataforma sumergida. Las diferencias estadísticas ($p < 0,01$) en la demora en encontrar la plataforma se observaron entre el grupo AI y el AU (*) y el AI con el joven (§) entre los días segundo y quinto de la prueba. (Resultados extraídos del estudio de Le Jeune *et al.* 1996).

RESULTADOS

Como se muestra en la tabla 4.5.1 y la figura 4.5.2, la unión específica de [3 H]lazabemide a las secciones cerebrales de los animales jóvenes dio valores entre 757 y 1.142 fmol/mg prot. en las diferentes áreas hipocampales. Todas las capas de la estructura hipocampal, incluyendo el giro dentado, de las ratas AU mostraron un aumento muy significativo de los niveles de marcaje de la MAO B (incremento medio del 91%). Este aumento no se observaba en ninguna área del hipocampo de las ratas AI (valores de unión entre 808 y 1.267 fmol/mg prot.). Sin

embargo en la capa granular del giro dentado la unión específica de [³H]lazabemide aumentaba débilmente en estas ratas pues su valor no difería estadísticamente ni del presentado por las ratas jóvenes ni tampoco del detectado en las AU.

En el septo la unión específica de [³H]lazabemide era de 1.319 ± 168 fmol/mg prot. en las ratas jóvenes (n = 12), 1.158 ± 164 fmol/mg prot. en el grupo de las AU (n = 15) y 1.326 ± 198 fmol/mg prot. (n = 15) en las AI (figura 4.5.2). Al compararlos, no se detectaron cambios significativos entre los tres grupos (KW = 0,747; p = 0,688).

Tabla 4.5.1: Niveles de MAO B en los diferentes estratos hipocampales

Área hipocampal	Grupo			
	Jóvenes (n = 26)	AU (n = 27)	%	AI (n = 40)
CA1 <i>oriens</i>	757 ± 126	1.560 ± 135***	106	832 ± 156
CA1 piramidal	993 ± 104	1.636 ± 147**	64	808 ± 177
CA1 radiada	1.129 ± 142	1.980 ± 143***	75	1.155 ± 176
CA1 <i>lacunosum moleculare</i>	1.142 ± 149	1.914 ± 133**	67	1.174 ± 165
CA3 <i>oriens</i>	823 ± 128	1.612 ± 173***	95	843 ± 157
CA3 piramidal	960 ± 109	1.599 ± 126**	66	920 ± 185
CA3 radiada	863 ± 118	1.941 ± 162***	124	1.046 ± 180
CA3 <i>lacunosum moleculare</i>	883 ± 137	1.719 ± 144**	94	1.043 ± 186
Circunvol. dentada ventral	825 ± 142	1.551 ± 141 ^{§§}	88	1.076 ± 165
Circunvol. dentada dorsal	916 ± 145	1.655 ± 131 ^{§§}	80	1.267 ± 139
<i>Hilus</i>	686 ± 133	1.601 ± 154***	134	973 ± 160

Unión específica *in vitro* de [³H]lazabemide. Los valores están expresados en fmol/mg prot. y son la media ± SEM. %, incremento de AU frente a las jóvenes. **, p < 0,01; *** p < 0,001 para las ratas AU frente a las jóvenes y las AI; ^{§§}, p < 0,01 para las AU frente a las jóvenes.

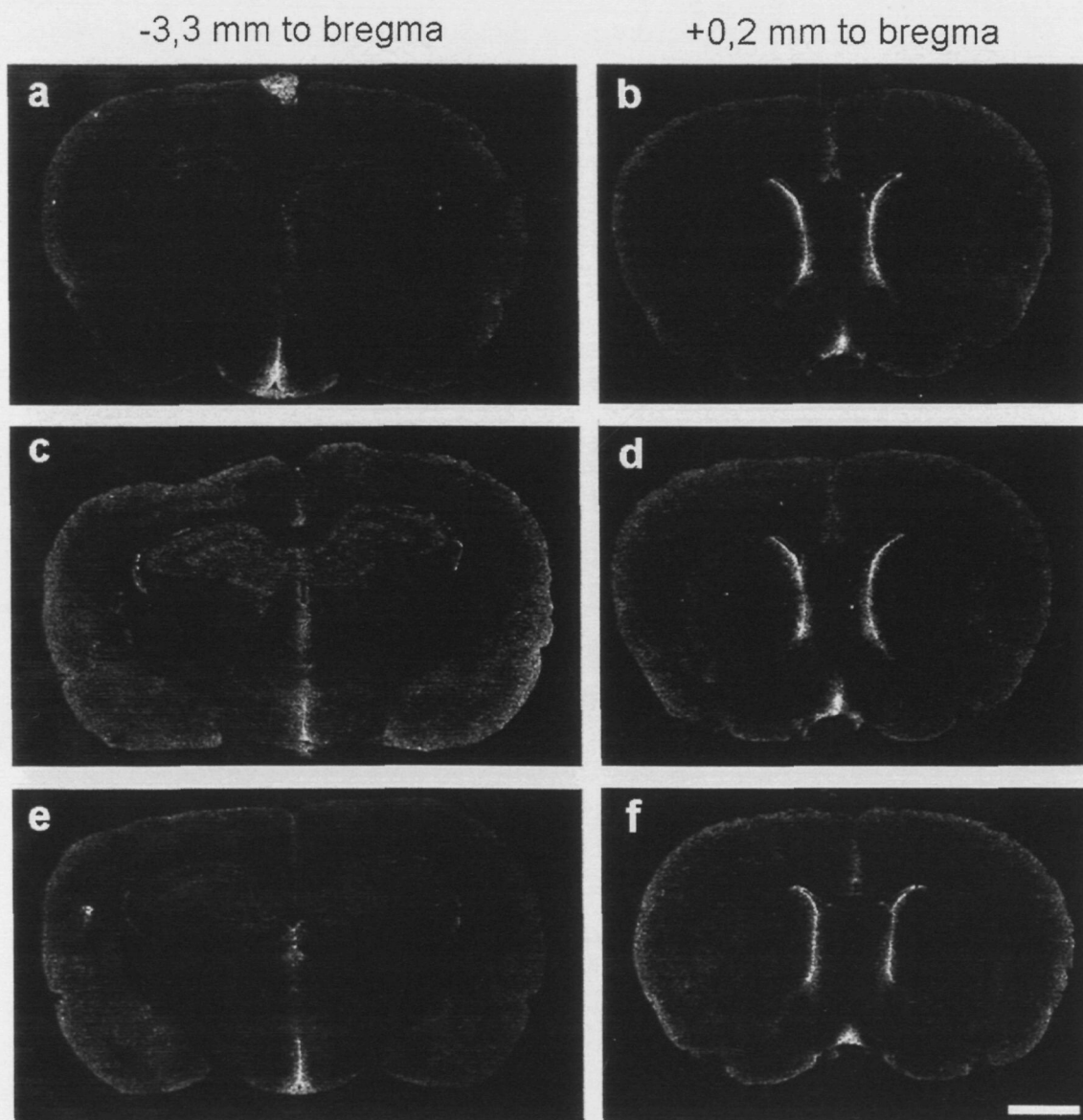


Figura 4.5.2: Distribución de la unión *in vitro* de [³H]lazabemide en secciones coronales de ratas jóvenes (a,b), AU (c,d) y AI (e,f). Barra: 2 mm

DISCUSIÓN

El incremento de MAO B dependiente de la edad en el cerebro humano (Saura *et al.* 1997) y de otros mamíferos ha sido demostrado en numerosos estudios (Fowler *et al.* 1980, Mahy *et al.* 2000, Saura *et al.* 1994, Strolin Benedetti *et al.* 1980) y correlaciona con la activación astrogliar descrita en numerosas áreas cerebrales (Tatton *et al.* 1991). Sin embargo, la falta de aumento de MAO B en las ratas AI es un dato nuevo que permite diferenciar

entre los dos grupos de animales viejos. Se ha descrito que, a pesar de la falta de correlación en el hipocampo entre el déficit cognoscitivo y los niveles de GFAP y la negativa correlación con otra proteína astrogliar, la superóxido dismutasa dependiente de manganeso, el ARN mensajero de ambas proteínas se encontraba aumentado significativamente en las ratas AI frente a las AU (Sugaya *et al.* 1996). Así, la sobreexpresión del RNA mensajero en las ratas AI parece diferente del observado en el envejecimiento normal y no se refleja en un aumento de la síntesis proteica. Debido a la diversidad de funciones de las MAO B, la GFAP y la superóxido dismutasa dependiente de manganeso, la reducción de la expresión en las ratas AI frente a las AU podría constituir un rasgo general del astrocito para adaptarse a la formación de lactato (Magistretti *et al.* 1999) y al consumo de glutamato (Hertz *et al.* 1999) en respuesta al incremento en la tasa del metabolismo oxidativo neuronal. En ratas adultas, la perturbación de memoria tras la infusión intracerebrovascular de cisteamina se ha asociado a cambios patológicos en los astrocitos hipocampales (St Jacques *et al.* 1999). Esto sugiere que la reducción de la expresión proteica de los astrocitos de las ratas AI pudiera también originar un declive cognoscitivo mayor.

De acuerdo con todo esto, el aumento de los receptores AMPA del glutamato encontrado en el hipocampo de estas mismas ratas AI pero no las AU (Le Jeune *et al.* 1996) no sería causado por una reacción astrogliar sino que sería consecuencia de una modificación neuronal en un intento de contrarrestar el deterioro cognoscitivo. Esta posible regulación neuronal podría también implicar a los receptores tipo NMDA ya que tampoco se encuentran disminuidos en el hipocampo de las ratas AI (Le Jeune *et al.* 1996) y son menos variables que los AMPA (Racca *et al.* 2000). Por otro lado, en todas las situaciones estudiadas, los receptores AMPA se mantuvieron invariables en el área septal, ocurriendo lo mismo con la astrogliar. Ello podría reflejar la variabilidad que presentan las diferentes áreas cerebrales en cuanto a la pérdida de las funciones cognoscitivas relacionadas con la edad.

En conclusión, este estudio indica que una reactividad atípica de los astrocitos hipocampales podría participar en las deficiencias de memoria asociadas a la edad. Si así fuera y aunque puede constituir uno más de los cambios patológicos gliales, el aumento de los receptores AMPA descrito en el

hipocampo de las ratas Al puede ser también interpretado como un intento neuronal para contrarrestar el daño cognoscitivo. Son necesarios, sin embargo, más experimentos para confirmar este corolario y clarificar el origen y razones de esta astrogliosis anómala.

