



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

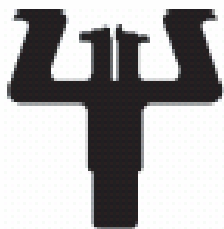
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**"EFECTO DE LA MEMANTINA EN LA ALTERACIÓN DE LA
RESPUESTA HIPOCAMPAL CAUSADA POR
LA NEUROINFLAMACIÓN"**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA
P R E S E N T A :
ELOHIM EMMANUEL ESPARZA RIVERA**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. VÍCTOR RAMÍREZ AMAYA



MÉXICO, D.F.

AGOSTO DE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Historia, que dio el sitio y las personas que han hecho posible el futuro del ahora.

O el temor a la verdad puede recatarse ante sí y ante otros detrás de la apariencia de que es precisamente el ardoroso celo por la verdad misma lo que le hace tan difícil y hasta imposible encontrar otra verdad que no sea la de la vanidad de ser siempre más listo que cualesquiera pensamientos procedentes de uno mismo o de los demás; esta vanidad, que se las arregla para hacer vana toda verdad, replegarse sobre sí misma y nutrirse de su propio entendimiento, el cual disuelve siempre todos los pensamientos, para encontrar en vez de cualquier contenido exclusivamente el yo escueto, es una satisfacción que debe dejarse abandonada a sí misma, ya que huye de lo universal y busca solamente el ser para sí.

G. W. F. Hegel

INDICE

	Pagina
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Consideraciones Generales sobre el Funcionamiento Cerebral	
2. Hipocampo; Una Estructura que Evidencia ciertas Propiedades Generales del Aprendizaje.	6
3. Medición de la Respuesta Hipocampal por medio de la Detección de Genes de Expresión Temprana	12
4. Demencia Senil y Alzheimer	17
5. La Neuroinflamación	22
6. El Efecto de la Memantina	30
MÉTODO	36
RESULTADOS	45
DISCUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	69

RESUMEN

Un problema fundamental para las neurociencias es el que atañe a la cuestión del aprendizaje y la memoria. Entre las teorías que tratan de estos procesos cognoscitivos, se halla la de Hebb, que básicamente concibe la memoria como sustentada por agrupaciones neuronales que cambian su modalidad funcional y/o estructural por la acción reverberante de sus conexiones sinápticas; esta idea de los ensambles neuronales, como se le denomina, ha cobrado apoyo empírico por descubrimientos de plasticidad cerebral tales como la potenciación a largo plazo.

Uno de los problemas que más afectan a la sociedad contemporánea son los padecimientos neurodegenerativos, en especial la enfermedad de Alzheimer (EA), ya que imposibilita a los sujetos para aprender y recordar nuevas tareas o acontecimientos sensoriales además de que se van perdiendo los que ya se tienen, lo cual, con el tiempo, conduce a los pacientes a la muerte.

Con el propósito de indagar la causalidad que subyace a estos padecimientos se han desarrollado modelos animales que reproducen algunas de sus condiciones fisiopatológicas, entre ellas, sobre todo, la neuroinflamación crónica y los daños asociados a estructuras como el hipocampo. Uno de estos modelos recientemente desarrollado para inducir la neuroinflamación crónica es el que utiliza la administración de lipopolisacárido (LPS). Este, a su vez, ha sido combinado con un moderno método de imagenología denominado, por sus siglas en inglés, catFISH, o análisis compartamental de la actividad neuronal temporal basado en hibridación in situ fluorescente, el cual se basa en el mapeo de un gen de expresión inmediata inducido conductuálmente, llamado Arc. Se sabe que la expresión del gen Arc en el hipocampo esta vinculada con la actividad de los receptores NMDA y con la formación del citoesqueleto, lo que lo relaciona estrechamente con la plasticidad cerebral. En un proceso de neuroinflamación los receptores NMDA se encuentran sobre-activados y el gen Arc, por tanto, alterado en su expresión.

El presente estudio se dio a la tarea de investigar si la alteración en la expresión hipocampal puede ser restituida a la normalidad gracias a la administración de un fármaco antagonista de afinidad moderada no competitivo del receptor NMDA, la memantina, el cual es utilizado actualmente para tratar la EA.

Los resultados fueron concluyentes en el sentido de que la memantina atempera significativamente el proceso de neuroinflamación, ya que disminuye la activación microglial que es la principal responsable de la inflamación del tejido, a la par que reestablece la expresión del Arc en el hipocampo. Es posible que la memantina logre tal efecto neuroprotector incidiendo sobre las neuronas, la excitación a la baja de las neuronas a su vez repercutiría sobre la glía para detener la respuesta inflamatoria.

Al reestablecer el dialogo normal neurona-glía, alterado por la neuroinflamación, la memantina revertiría el círculo vicioso que incrementa la excitación glutamatérgica y la consecuente alteración del Arc. Esto llevaría a la recuperación de la actividad coordinada de los circuitos sinápticos, lo que a su vez se traduciría en una producción eficaz de los procesos de memoria con la consecuente posibilidad de incorporar nuevos ensambles neuronales a los ciclos de fase ya existentes.

INTRODUCCIÓN

1. Consideraciones Generales sobre el Funcionamiento Cerebral

Con el enfoque que se desprende de la escuela reflexológica y conductista, el sistema nervioso central se concebía como una entidad pasiva que solo establecía una respuesta según la estimulación que recibía. Toda espontaneidad o predisposición que se le pudiera atribuir se consideraba como una pretensión vitalista y por tanto metafísica. Sin embargo, ahora se sabe que las respuestas de cualquier organismo no se dan por las repercusiones directas que causan los estímulos, sino que están mediadas por la acción de circuitos neuronales que construyen una percepción determinada, una constancia sensorial interna dada por procesos centrales a partir de las condiciones de estimulación siempre variantes que provienen del entorno. Así, la codificación de la información sensorial en el cerebro conforma un mundo perceptivo interior, el reflejo de la realidad por la cual responde el animal, que es sostenido por redes complejas de ensambles neuronales, patrones de actividad temporalmente correlacionados mediante sistemas sinápticos específicos, determinados probabilísticamente.

Este postulado, que se insinuaba ya con los descubrimientos de la psicología de la Gestalt, despunta y es depurado de todo misticismo en los años cuarenta gracias a los trabajos de la escuela etológica, así como con la teoría de Hebb (1949) respecto a los procesos de aprendizaje dados por la facilitación y consolidación de determinados circuitos nerviosos.

Ambas teorías, la etología y la teoría neurofisiológica de Hebb, coinciden en la perspectiva de que el análisis de los procesos perceptivos y de la conducta deben darse en distintos niveles: fisiológico, conductual y psicológico, lo cual se basa en la noción de que la explicación en cada nivel debería de coincidir y complementarse, puesto que al fin y al cabo se habla del mismo fenómeno, el de la cuestión material del comportamiento y del pensamiento.

Hebb trata de hacer notar la necesidad fundamental de una teoría fisiológica del pensamiento que pueda aplicarse tanto a los animales como al humano. Reconoce la incidencia de la unidad sensorial primitiva formada por mecanismos innatos como elemento de la percepción, poniendo énfasis en el aprendizaje que interactúa con estos mecanismos innatos, lo que permite al animal otorgarle identidad a las figuras que observa, de acuerdo a la evaluación de similitudes y diferencias.

“...la identidad es una importante propiedad de la percepción que es preciso deslindar cuidadosamente de la unidad... La unidad, una propiedad inmediata de la dinámica sensorial, puede estar determinada de forma innata, mientras que la identidad depende de una experiencia prolongada (Hebb, 1949).”

Su teoría se plantea en medio de una problemática que entiende al aprendizaje y la memoria bajo la siguiente contradicción: por un lado se piensa que la representación mnémica es equipotencial, lo que implica que las células nerviosas y su ubicación anatómica no son relevantes, sino solo el patrón específico de ésta actividad (Lashley, 1922). Por lo que la generalización de las percepciones es causada por la transferencia de un encendido neuronal coordinado de una región neuronal a otra; por otro lado, se considera también que la memoria se sostiene mediante una huella que descansa en conexiones neuronales específicas, en circuitos estructurales rígidos responsables de una u otra percepción, lo que también se conoce como localizacionismo.

Hebb resuelve esta problemática proponiendo una especie de punto medio entre las dos posturas. Retoma las premisas de dichas teorías pero bajo una conceptualización que las entrelaza de un modo novedoso y coherente, pues a la vez que las distingue las concilia:

“...reconoce una acción de campo limitada en las áreas de proyección sensorial y una especie de equipotencialidad restringida entre células que están en paralelo funcional en algún sistema fisiológico... esta hipótesis derivará la transferencia de respuesta a partir de hábitos previamente establecidos y de conexiones específicas (Hebb, 1949).”

Existen en el tejido nervioso, por tanto, zonas donde la conectividad es menos modificable, probablemente por que los circuitos neuronales implicados están encargados de funciones muy importantes desde el punto de vista de la supervivencia, y por otro lado, ensambles celulares más plásticos que cambian con mayor propensión su modalidad funcional o estructural por la acción de la experiencia. Entre unos y otros existe una graduación y una coordinación constante, siendo así que el aprendizaje parece ser el reacomodo posible, de acuerdo a la especie, entre los circuitos innatos, reacomodo que incluye y excluye nuevas conexiones de acuerdo a la experiencia, al interior de los subsistemas sensoriales, al de los subsistemas motores y entre ambos.

En este sentido, concibe la posibilidad de un mecanismo dual de huellas o memorias, unos transitorios que mantienen la vigencia del estímulo por un periodo de tiempo breve –memoria a corto plazo- gracias a la acción de un patrón de actividad neural casi independiente de cualquier cambio estructural; y otros más permanentes causados por cambios estructurales que pueden seguir a la actividad reverberante inicial consolidando las conexiones entre las células en que se dio –memoria a largo plazo-. De estas nociones surge su postulado neurofisiológico fundamental:

“Cuando el axón de una célula A está lo bastante cercano a una célula B como para excitarla y participa repetida y persistentemente en su disparo, tiene lugar algún proceso de crecimiento o cambio metabólico en una o ambas células, de modo que la eficiencia de A, como una de las diversas células que hace disparar a B, aumenta (Hebb, 1949).”

Con este postulado se pone de manifiesto la manera en que procede el sistema nervioso central para formar, como un todo organizado, percepciones y patrones de movimiento. Cuando una sinápsis se activa al mismo tiempo en que lo hace un determinado circuito neuronal o ensamble de neuronas, ésta pasa a ser reclutada por aquel, de tal forma que la activación reiterada consolida su inclusión en este. Los cambios que ahora conocemos como plasticidad, son el producto de la retroalimentación reverberante de un determinado conjunto de

células que fortalece sus sinápsis y las mantiene activadas como un ciclo de fase, lo cual es el correlato fisiológico de la formación de conceptos y memorias.

Este modelo original de los ciclos de fase producidos a partir de la organización de ensambles neuronales, distinguía unos ensambles de otros de acuerdo al ritmo con el que se activaran las células que las conforman, sin embargo, esto no permite diferenciar ensambles que están coactivados ya que no se puede saber cuales neuronas pertenecen a cada uno. En la actualidad el concepto de ensamble celular se define por el encendido neuronal correlacionado temporalmente con los eventos de estimulación, incluyendo a la conducta.

De acuerdo a esto, se pueden destacar varias propiedades importantes de los ensambles neuronales: el traslape implica que una misma neurona puede participar en múltiples ensambles de representaciones diferentes; la escasez de la respuesta que codifica la información, se refiere a que un ensamble de representación debe de incluir al menor número posible de células para que la eficiencia mnémica del sistema se optimice; la construcción y reconstrucción dinámica del ensamble, se refiere a la flexibilidad de las conexiones que permiten que un ensamble se establezca o se modifique; la propiedad de persistencia dinámica, que afirma que un ensamble tenderá a persistir en el tiempo y que por medio de la reactivación de las conexiones entre sus miembros pueden cambiar; la propiedad del acompletamiento dinámico, que hace referencia a que la activación grande o suficiente de un subgrupo de un ensamble celular resulta en la activación del ensamble celular completo (Sakurai, 1999).

En consecuencia, es preciso generar modelos que tomen en cuenta las propiedades dinámicas de los sistemas neuronales, las múltiples entradas por las que se accede a una información determinada y las sutiles variaciones en sus reacomodos, que producen representaciones de contextos diferentes.

2. Hipocampo; Una Estructura que evidencia ciertas Propiedades Generales del Aprendizaje.

De acuerdo a lo que hemos explicado acerca de la propuesta de Hebb, queda claro que los cambios en la comunicación sináptica son de gran importancia para la formación de la memoria. Hoy en día se reconoce que en el sistema nervioso pueden ocurrir cambios en la comunicación entre las células y a esto se le conoce como plasticidad sináptica.

La plasticidad sináptica es el sustrato que subyace al aprendizaje y la memoria, procesos que se pueden definir, al nivel del comportamiento, como la modificación de la conducta del organismo debido a la experiencia previa. Durante el aprendizaje se producen cambios en las sinápsis, tanto funcionales como anatómicos, los cuales modifican su eficiencia y reacomodo como consecuencia de la estimulación. En 1970 Bliss y Lomo describieron un importante ejemplo de plasticidad sináptica que se conoce como potenciación a largo plazo (PLP). En este modelo, un patrón de estimulación de alta frecuencia de una vía modifica la eficacia de las conexiones sinápticas involucradas (ver Figura 11); dicha potenciación puede durar un tiempo prolongado (horas, días e incluso semanas).

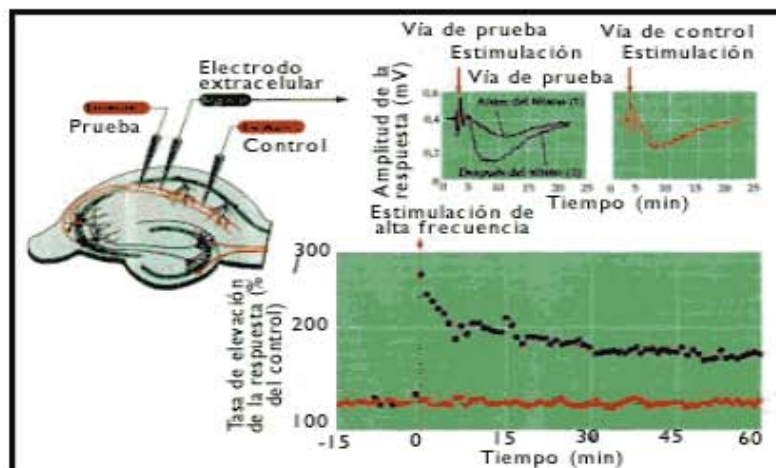


Figura 11.- Bliss y Lomo demostraron que la estimulación de alta frecuencia en la vía perforante, que hace sinápsis con las dendritas de células del giro dentado, produce un subsecuente incremento en la amplitud de sus potenciales de acción excitatorios postsinápticos que se prolongaba incluso por días. A este fenómeno se le conoce como Potenciación a Largo Plazo (PLP) homosináptico pues corresponde a las mismas células estimuladas.

La propuesta teórica de Hebb se validó empíricamente, al menos en algunos de sus aspectos fundamentales, con el descubrimiento de la PLP, así como con el descubrimiento de que uno de los cambios que subyace a la plasticidad es el engrosamiento de los botones sinápticos.

Si bien la PLP es uno de los más importantes modelos de plasticidad sináptica que explican la formación de la memoria, sus implicaciones son más relevantes cuando se comprenden dentro de la noción de ensamble. De tal forma que los cambios estructurales que supone el aprendizaje, tales como el cambio de eficiencia de la sinápsis por una despolarización de receptores neuronales, que facilita el disparo o el engrosamiento de los botones terminales, así como el crecimiento o desaparición de nuevas ramificaciones, deben entenderse como los procesos concretos que permiten la fragmentación y el reclutamiento constante a que se hallan sujetos los ciclos de fase neuronales (Hebb, 1949).

Así, el hipocampo es una estructura en la que se han encontrado neuronas que se comportan de acuerdo a la noción de ensamble, y cuya función en la consolidación de eventos recientemente aprendidos se ha puesto en evidencia desde hace mucho tiempo (Milner, 1966). En lo particular, se reconoce que cumple una función sobresaliente para la representación espacial, lo cual se hizo patente con el descubrimiento de las células de lugar, particularmente en CA1, aunque después se describieron también en CA3 y en el giro dentado (GD), entre otras regiones.

Las células de lugar muestran un incremento en la frecuencia de disparo cuando el animal se localiza en un lugar particular durante la exploración de un ambiente (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). El área sobre la cual las células responden se denomina su campo receptivo espacial. Por tanto, estas células se caracterizan electrofisiológicamente porque su disparo se halla relacionado con un lugar específico. Se localizan células de lugar que responden a una esquina del ambiente de exploración, otras a una pared y otras en el centro, etc. (Ver Figura I2), de tal manera que cuando se registran grupos de células se observa que muchas presentan un campo receptivo espacial en un ambiente

determinado. El descubrimiento de las células de lugar sustenta la noción de la generación de mapas cognoscitivos propuesta por Tolman (1948) y fue utilizado por Nadel (1978) para proponer la teoría del hipocampo como un generador de una representación holística del entorno espacial.

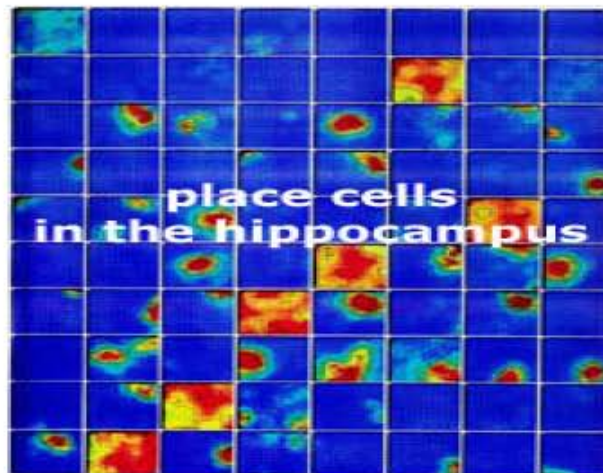


Figura 12.- Cada cuadrícula representa el ambiente de exploración, el color que predomina en cada uno representa el registro de la activación de una célula de lugar, del color rojo, como la mayor intensidad de disparo, hasta el azul oscuro, como la menor intensidad de disparo. Se puede observar que algunas neuronas responden a todo el ambiente de exploración mientras que otras solo a una parte de este, a una esquina, al centro, a la zona inferior, etc.

Si sometemos a un animal dos veces a la misma condición de exploración espacial, el mismo patrón de actividad en las mismas células se repite, a esto se le conoce como estabilidad de las células de lugar. Por el contrario, si el lugar cambia, el patrón de respuesta de dichas células también lo hace, a esto se le conoce como re-mapeo (Jeffery y Hayman, 2004). En la estabilidad el grupo de células que respondió originalmente al ambiente tiende a hacerlo nuevamente en el mismo ambiente con alta probabilidad, mientras que en el re-mapeo un grupo diferente de células se selecciona por medio de un reemplazo aleatorio de la entidad (Marr, 1971). Lo anterior constituye el sustrato de las distintas percepciones que el animal utiliza para comportarse; cada código representado por un patrón determinado de actividad celular corresponde a una episodio mnémico diferente.

De esta manera, la formación hipocampal participa para la articulación de una representación interna abstracta del contexto en que se encuentra el

individuo, tal codificación espacial, de carácter bidimensional, funciona como la referencia general interna que permite al animal organizar su conducta de navegación, por la que el individuo puede guiar sus movimientos sin la necesidad de otras marcas del ambiente (McNaughton et al., 1996).

Por otro lado, las investigaciones actuales han puesto de manifiesto que el giro dentado, una de las regiones que conforman el hipocampo y la única que cuenta con células granulares, muestra también actividad de células de lugar (Jung y McNaughton, 1993; Gothard et al., 2001). El giro dentado lleva a cabo una función indispensable en la formación de la memoria espacial, y se considera que la función principal es ortogonalizar las entradas de información sensorial para crear un sistema de representación espacial (Kesner et al., 2004).

De esta manera, el GD junto con la región de CA3 del hipocampo llevan a cabo la distinción de patrones espaciales, lo que permite procesos como la discriminación y el reconocimiento de lo familiar. La región de CA3 está involucrada en la asociación, separación y completamiento de patrones (discriminación y generalización), detección de novedad y memoria a corto plazo. La región de CA1 es la única subregión del hipocampo que proyecta vías eferentes a la corteza, está involucrada en asociación temporal, completamiento de patrones y memoria a mediano plazo (Kesner, et al., 2004).

Así, por ejemplo, cuando se introduce un roedor en un determinado entorno, muy pocas de las células granulares (aprox. 2%) del giro dentado responden como células de lugar. Esto contrasta con la respuesta que presentan células piramidales en regiones como CA1 y CA3, en donde la proporción de células que responden es de ~40% y ~20% respectivamente (Leutgeb et al., 2004). Estos datos muestran una activación diferencial de las subregiones de esta estructura, las cuales presumiblemente reflejan un papel distintivo en las capacidades mnémicas de cada una. Existe, de esta forma, una pérdida progresiva de la selectividad espacial y de escasez en el encendido de la población de neuronas, si se va de CA3 a CA1 y de CA1 al subiculum y a la corteza entorrinal. Esto muestra que la forma de codificación del entorno es tanto más eficaz por cuanto involucra a un escaso número de neuronas, ya que

mientras más pequeño sea el ensamble que procesa la información de una situación espacial total, menos traslape tiene con otros ensambles que almacenan otras informaciones, lo que hace que la capacidad mnémica del giro dentado sea más alta y más precisa (Sakurai, 1999; Chawla et al., 2005).

Sin embargo, la cuestión es compleja, puesto que se sabe que las células granulares del hipocampo son necesarias para un eficaz establecimiento de memorias espaciales, pero no para la activación de células de lugar en CA1 y CA3 (McNaughton, 1989). Esto significa que sin el giro dentado no se pueden reconocer condiciones contextos espaciales como novedosas o familiares, dado que no se cuenta con la información mnémica al respecto, no obstante, esto no implica que la respuesta espacial inmediata de orientación se vea afectada después de la destrucción del giro dentado; lo cual indica que existe una cierta autonomía entre los procesos de orientación y aprendizaje.

Como se observa, el hipocampo contiene distintas poblaciones neuronales organizadas dentro de subregiones anatómicas específicas. Cada subregión hipocámpal expresa un único perfil molecular que es el responsable de las diferencias, en cuanto la vulnerabilidad se refiere, en las disfunciones de los mecanismos de memoria (Small et al., 2004). Esto significa que existe un número de diferencias en relación a la cantidad y la estructura celular, responsividad funcional y en la conectividad cortical y subcortical entre las áreas de la formación hipocámpica, que ponen al tanto las dificultades de discernir el papel que tiene cada una de sus regiones para el almacenaje de los recuerdos espaciales.

De igual manera, el problema de cual subregión hipocámpal es más propensa a deteriorarse con el avance en el ciclo vital, aun permanece poco clara. Aunque numerosos estudios sugieren alguna pérdida celular con la edad, comparada con la neurodegeneración, el envejecimiento se caracteriza por una relativa ausencia de una franca muerte celular y por marcas definitivas de un carácter histopatológico (Gallagher et al., 1997). Esta característica fisiológica del envejecimiento cuenta, en gran medida, para la dificultad de identificar cuales son las partes de la formación hipocámpal más sensibles al proceso de

envejecimiento. No basta con cuantificar la disfunción sináptica en el tejido postmortem, puesto que toda la formación hipocámpal esta interconectada (ver Figura I3) la disfunción en una subregión afecta a las propiedades fisiológicas de las otras subregiones, por lo que el circuito como un todo también se ve afectado por medio de mecanismos trans-sinápticos (Barnes, 1994).

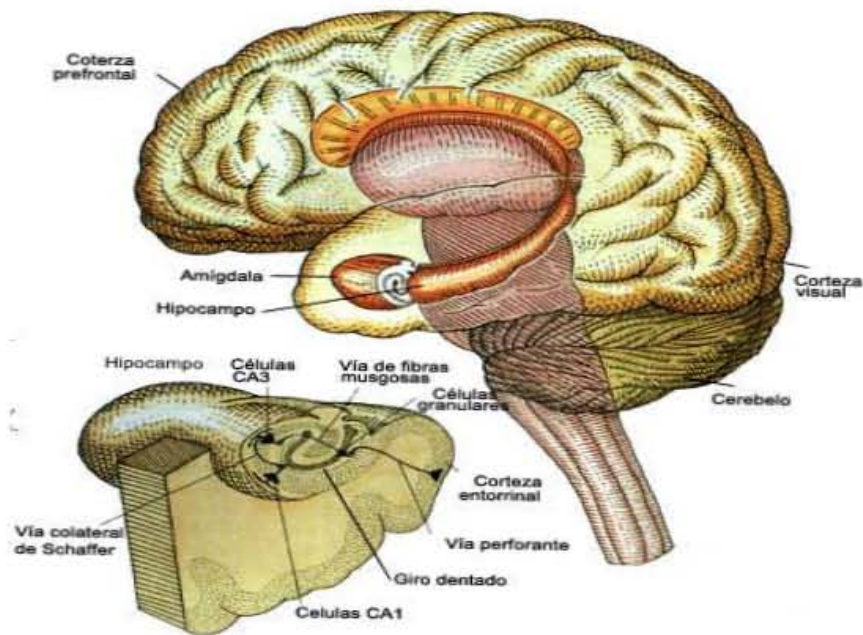


Figura I3.- La información fluye hacia y a lo largo del hipocampo por medio de tres vías principales que están indicadas en la imagen ampliada que se ve a la izquierda de la figura: 1, la vía perforante que circula desde la corteza entorrinal a las células granulares del giro dentado. 2, la vía de las fibras musgosas que va desde las células granulares del giro dentado a las piramidales de la región CA3 del hipocampo. 3, la vía colateral de Schaffer que proyecta desde las células de la región CA3 a las de la región CA1.

Por ello, evaluar la función integral de cada subregión hipocámpal individualmente así como simultáneamente en sujetos vivos, es una aproximación efectiva para discernir el primer sitio donde se da la disfunción del hipocampo relacionada con la edad. Esto se ha hecho utilizando métodos que combinan técnicas de imagen que evalúan diferentes correlatos del funcionamiento neuronal en distintas especies: imágenes de resonancia magnética para mapear el volumen sanguíneo cerebral, correlato del metabolismo basal, e hibridación in situ para mapear la expresión de Arc (técnica que explicaremos mas adelante) en las subregiones hipocámpicas.

3. Medición de la Respuesta Hipocampal por medio de la Detección de Genes de Expresión Temprana

Una de las formas de estudiar las células de lugar es por medio de la detección de genes de expresión temprana inducidos por actividad celular, lo que nos permite tener una resolución anatómica precisa. Así, se ha desarrollado un moderno método de imagenología denominado por sus siglas en inglés catFISH, o análisis compartamental de la actividad neuronal temporal basado en hibridación in situ fluorescente, con el que se puede identificar las unidades celulares que responden ante una estimulación conductual. Este método se basa en la estrategia de identificar neuronas que expresan genes inducidos por actividad que se translocan rápidamente al citoplasma, de tal manera que se pueden localizar células activadas por al menos dos diferentes eventos conductuales con una muy buena resolución celular, junto con una discreta resolución temporal en el orden de minutos. La identificación del gen de expresión inmediata *Arc* o *Arg3.1* (Lyford et al., 1995; Link et al., 1995) permitió el desarrollo de catFISH (Guzowski et al., 1999).

Lo importante para esta técnica de imagenología es que *Arc* se expresa solo a consecuencia de una fuerte actividad celular, semejante a la que se genera durante la exploración espacial cuando las células muestran campos receptivos espaciales. *Arc* se transloca rápidamente al citoplasma (20 minutos después de su expresión inicial) y deja de detectarse minutos después. A consecuencia de estimulación máxima como choques electroconvulsivos se puede observar la expresión de *Arc* en prácticamente todas las regiones cerebrales, lo que en principio sugiere que se puede realizar un mapeo de la actividad neuronal de todo el encéfalo con el uso de este método. La detección del ARNm de *Arc*, con hibridación in situ fluorescente, permite localizar *Arc* tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula dependiendo del momento en el que se indujo su expresión: esto es, de 2 a 5 minutos después de ser inducida la expresión de *Arc*, podemos identificar su ARNm en el núcleo como dos focos de expresión que representan a cada uno de los hálelos del gen (Ver Figura I4).

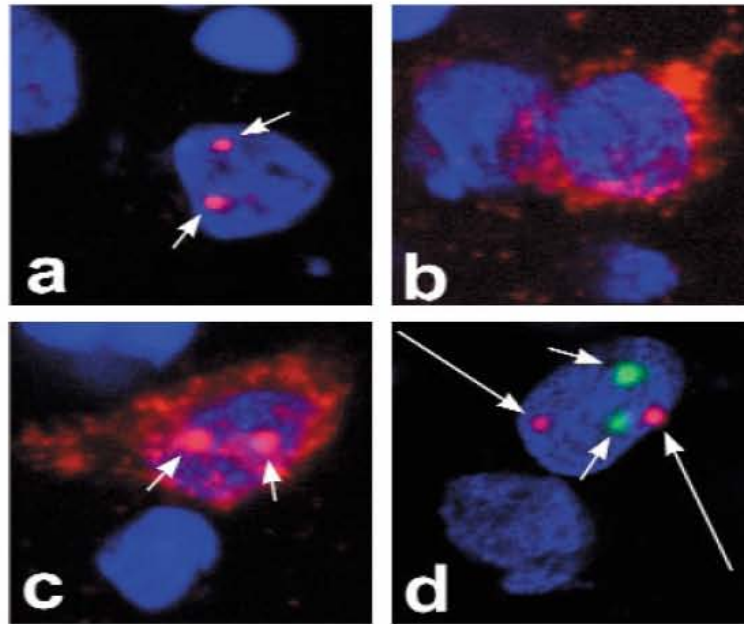


Figura 14.- La tinción azul marca los núcleos celulares, la tinción roja la expresión de Arc. En el recuadro "a" se muestra los dos hálelos del gen, es decir, Arc nuclear; en el recuadro "b" la tinción rodea el núcleo de la neurona por lo que se considera Arc citoplasmático; en el "c" se observa tinción tanto afuera como adentro, es Arc de ambos tipos; en el recuadro "d", por último, es tinción de Arc nuclear y la tinción verde es el gen de expresión inmediata Homer 1a.

El ARNm de *Arc* se mueve rápidamente al citoplasma y se puede localizar claramente alrededor del núcleo 30min después de su inducción. Estas características permiten identificar grupos de células activadas por un evento inmediato (cuando *Arc* se localiza en el núcleo) y células activadas por un evento que ocurrió 30min antes (cuando *Arc* se localiza en el citoplasma). Las células que presentan Arc tanto en el núcleo como en el citoplasma habrán sido activadas por ambos eventos. El método de catFISH utiliza microscopia confocal para la obtención de las imágenes, de tal forma que el análisis se realiza en apilados de imágenes que permiten una visualización en 3D de los grupos de células de interés. Esto permite realizar una cuantificación precisa de las células que expresan los genes minimizando errores o problemas estereológicos. Así, es posible identificar grupos de células que responden a uno de dos eventos conductuales separados por un periodo de tiempo de ~30 min.

La importancia de estudiar la expresión de Arc es que parece ser un eslabón fundamental involucrado en el establecimiento de ensambles de representación espacial, ya que es un gen efector de expresión inmediata que se induce por actividad eléctrica en células neuronales. El ARNm de *Arc* tiene la

peculiar característica de que viaja a las regiones activas de las dendritas en donde puede ser traducido localmente (Steward y Worley, 2001). La secuencia de *Arc* presenta una alta homología con espectrina y co-precipita con F-actina (Lyford et al., 1995), estas son importantes proteínas del citó-esqueleto. En células de neuroblastoma *Arc* induce el crecimiento de neuritas cuando interactúa con CAMKII (Donai et al., 2003).

La transcripción del ARNm de *Arc* se induce por la activación del receptor NMDA (Steward y Worley, 2001) siguiendo la entrada de los iones de calcio y la activación de AMPc (Waltereit et al., 2001). Tras una experiencia conductual, se activa la expresión del ARNm de *Arc* y este se traduce fielmente a proteína en ensamblajes neuronales del hipocampo y la corteza parietal (Ramírez-Amaya et al., 2005). Por ello, es de suma importancia para la consolidación de memorias espaciales y para el establecimiento de plasticidad sináptica como el PLP. El escalamiento sináptico es importante para mantener los cambios plásticos en la eficiencia sináptica a largo plazo. Todo esto apunta a que *Arc* cumple una relevante función plástica, lo que se ha hecho evidente mediante el uso de oligos antisentido administrados directamente en el hipocampo, que al inhibir la traducción del ARNm de *Arc* a proteína impiden el mantenimiento de la PLP y afectan la consolidación de memorias espaciales (Guzowski et al., 2000).

En correspondencia con esto, cuando la actividad de *Arc* es selectivamente bloqueada en el hipocampo, la potenciación a largo plazo decae más rápidamente con los días, además de que se da una retención conductual reducida de la locación de la plataforma escondida en la prueba de nado de Morris (Guzowski et al., 2000; Bramham y Messaoudi, 2005). Esta última tarea conductual consiste en introducir a un animal en un tanque lleno de agua, de tal forma que el individuo realiza una serie de movimientos, al principio al azar, por toda la superficie hasta que logra encontrar una plataforma que le permite mantenerse por encima del agua. Esto, en la medida en que la rata es un animal terrestre e instintivamente le tiene aversión al agua, funciona como reforzador negativo que disminuye progresivamente el tiempo de llegada. Esta tarea es útil, entre otras cosas, porque se puede ir variando la posición de la plataforma y

registrar los cambios en el tiempo de llegada, lo cual es un índice del aprendizaje subyacente y, por tanto, de la formación de un mapa cognoscitivo que el animal utiliza para adaptarse.

Un importante dato es que la misma proporción de células que presentan actividad electrofisiológica de células de lugar en un ambiente determinado, expresa Arc en las mismas condiciones conductuales. Estos es, 40% de las células en CA1, 20% en CA3, 2% en el giro dentado y 50% en la corteza parietal expresa Arc a consecuencia de la exploración (Vazdarjanova et al., 2002; Ramírez-Amaya et al., 2005) y es esta la misma proporción de células que en dichas regiones presenta campos receptivos espaciales en las mismas condiciones conductuales; la detección de Arc, así, es congruente con estudios electrofisiológicos y permite identificar las células plásticas relacionados a la conducta espacial.

Si se somete a un animal dos veces a un mismo ambiente espacial, ese 40% de células en CA1 que presentaron respuestas específicas a un lugar en el espacio, responderá de manera semejante en ambas ocasiones. A esto se le llama estabilidad de las células de lugar o estabilidad del mapa cognoscitivo. Si por el contrario se somete a los animales a dos ambientes distintos, se observara que un grupo independiente de células de lugar responderá ante el segundo ambiente, y las células que respondieron al primer ambiente responderán de manera diferente (con otro campo receptivo espacial) o bien no responderán ante el segundo ambiente (ver Figura I5). A esto se le conoce como re-mapeo ("re-mapping") o re-estructuración del mapa (Jeffery y Hayman, 2004).

Este método nos permite identificar grupos de células que se activan ante uno u otro evento de exploración, o bien ante ambos. Esto permite evaluar la estabilidad de la red neuronal cuando se trata de dos eventos semejantes, en donde se espera que el mismo conjunto de células se activen; se puede medir el grado con el que un conjunto de células es capaz de discriminar dos eventos diferentes (Vazdarjanova y Guzowski, 2004), o el mismo.

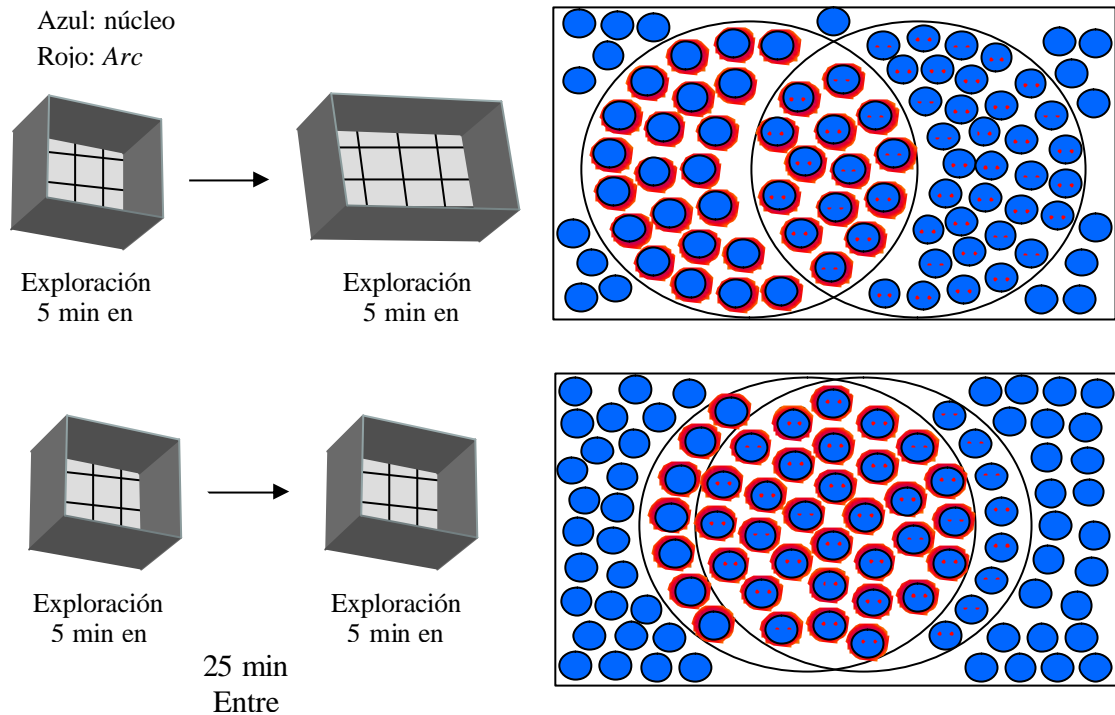


Figura 15.- La parte de arriba muestra que cuando animal es introducido a dos ambientes diferentes dos grupos distintos de neuronas responden, lo que se observa por la pequeña cantidad de células expresando tanto Arc nuclear y citoplasmático –lo cual es un correlato representativo de los elementos espaciales comunes a los dos ambientes- comparada con la mayor cantidad de neuronas expresando cada uno de estos por separado –lo cual es correlato representativo de los elementos disímiles de los ambientes-. En la parte de abajo sucede de lo contrario y la forma en que las células expresan Arc es, en consecuencia, la inversa.

Ahora bien, la activación del Arc en los cuernos de Ammon y la corteza parietal se manifiesta en ondas temporales de expresión, una primera dada entre los 30min a 2hrs después de la exploración espacial y otra onda de las 8 a las 24hrs posteriores (Ramírez-Amaya et al., 2005). Esta segunda onda no implica todo el ensamble neuronal activado inicialmente, ya que solo se da en un subgrupo de este, lo cual puede ser explicado con la hipótesis de que un grupo de neuronas es el que codifica la experiencia espacial, pero solo un subgrupo de estas neuronas puede funcionar para elicitar los patrones de actividad necesarios para recordar dicha experiencia. Así mismo, puede que la reactivación de Arc en la segunda ola solo se de en el subgrupo de células del ensamble inicial que requieran mayores cambios para procesar la nueva experiencia adquirida. En todo caso, es patente que Arc puede funcionar como una marca anatómica de la actividad sináptica que subyace a la consolidación de la memoria (Ramírez-Amaya et al., 2005).

4. Demencia Senil y Alzheimer

Uno de los mayores problemas que deshabilitan personas en el mundo entero, física y laboralmente, es la demencia. La enfermedad de Alzheimer (EA), que es una de las principales causas que conllevan a la demencia, ocupa el cuarto lugar de muerte en EUA (Lipton, 2006). Por esto es de gran relevancia aportar evidencia que esclarezca la patogénesis de esta enfermedad, y con mayor razón si se toma en cuenta que esta enfoca sus disfunciones sobre los procesos de aprendizaje y memoria; En consecuencia, elucidar los mecanismos patológicos de esta enfermedad contribuirá, sin duda, a la comprensión de los mecanismos saludables que rigen dichos procesos cognoscitivos

Aunque históricamente se había pensado que una pérdida masiva de neuronas y un deterioro en la arborización dendrítica eran los factores principales en la etiología del decline de las funciones cognoscitivas asociadas al envejecimiento, ahora se sabe que los cambios que ocurren durante el envejecimiento normal son mas sutiles y selectivos de lo que antes se creía. De hecho, parece ser que en general los mayores daños conductuales asociados con la edad resultan de cambios específicos a la región en la morfología dendrítica, conectividad celular, desregulación de calcio, expresión de genes u otros factores que afectan la plasticidad y posteriormente alteran la dinámica de las redes de los ensambles neuronales que soportan a la cognición (Barnes y Burke, 2006). Una perspectiva comparada que indague los cambios acaecidos en el cerebro envejecido normalmente y el cerebro dañado por alguna enfermedad neurodegenerativa, puede aportar pistas para elucidar los procesos que deterioran el aprendizaje y la memoria.

Existen diversas condiciones que predisponen a contraer el Alzheimer, entre estos destaca la edad avanzada como el mayor factor de riesgo, señalándose además otros que involucran desde los genéticos hasta los sociales. La mayor parte de estudios sobre la prevalencia de la demencia no muestran diferencias de acuerdo al sexo. Sin embargo, se señala que en los países desarrollados parece ser más frecuente la EA en mujeres,

en comparación a los varones. Según Cummings (2003), el riesgo de afectarse la mujer en relación al varón va de 1.2:1 a 1.5:1.

De igual forma, se ha logrado determinar la importancia del nivel educativo y del ejercicio intelectual en el deterioro cognitivo. La asociación con demencia puede explicarse por el concepto de “reserva neurológica”. Se estima que aquellos que han tenido mayor nivel educativo, han tenido oportunidad de desarrollar mayor número de sinápsis, por lo que los síntomas aparecerían más tarde, ofreciendo la reserva neurológica mayor resistencia para iniciar la enfermedad y controlar la progresión de la misma. Algunos estudios han encontrado en una muestra de 5 500 personas, que en 27% de ellas que no tuvieron una educación formal la preevalencia de demencia fue el doble, comparada con aquellas que por lo menos habían logrado algún nivel de educación secundaria (EURODEM 1999).

Diversas investigaciones, incluyendo las del EURODEM (1999), ubican a los traumatismos craneoencefálicos como factor de riesgo para EA, particularmente en aquellas personas con predisposición genética. En los cerebros de boxeadores con demencia pugilística se han encontrado características similares, a las observadas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Con base en estos estudios, se ha descrito que la presencia de uno o más familiares con demencia constituye un riesgo para la EA, encontrándose en general 10 y 15% de antecedentes familiares de dementes tipo Alzheimer entre los pacientes con esta enfermedad.

Dada la complejidad en sus causas aun permanece desconocida la etiología de esta enfermedad, pero es probable que la patología ocurra tiempo antes de su expresión clínica, habiendo variación individual en la intensidad de los síntomas y momento de presentación; Lo que si es claro es que este padecimiento representa un fenómeno de muerte neuronal precoz que cursa con diversas alteraciones, anatomopatológicas y neuroquímicas.

Durante el envejecimiento cerebral se generan cambios en diversas áreas cerebrales, incluyendo la formación hipocampal. Esto explicaría por qué algunos

adultos mayores, sin ser portadores de la EA, tendrían cambios en dicha región y problemas de memoria. El hipocampo es una de las primeras estructuras que se alteran con la EA, lo que explica el porque las deficiencias en la memoria son los primeros signos que generalmente aparecen. Ahora bien, la afectación a dicha estructura no ocurre de manera homogénea, algunos estudios sugieren que los portadores de lesiones selectivas del subículo y no de la zona entorrinal probablemente no progresen a la EA (Scheff y Price, 2003). En este sentido, aunque esta enfermedad afecta principalmente el funcionamiento de la corteza y el hipocampo, son particularmente las células granulares del giro dentado las que mas resultan dañadas por el avance de la patología. Así, se han demostrado significativas pérdidas de conectividad sináptica en muchas regiones del hipocampo y de la neocorteza; la correlación entre el progresivo deterioro cognoscitivo y una pobre densidad sináptica es claramente manifiesta (Scheff y Price 2003).

A nivel histopatológico, el padecimiento se caracteriza por una presencia incrementada de marañas u ovillos neurofibrilares conocidos también como tangles, (ver Figura I6b) se deben a la alteración de proteínas citoestructurales neuronales (túbulos y filamentos) de proteínas [t] y MAP2 (microtúbulos asociados a proteínas) que se fosforilan anormalmente. Esta alteración de ensamblaje y desensamblaje anormal de microtúbulos altera el transporte intracelular y ocasiona muerte celular. Inicialmente están presentes en la corteza transentorrinal y luego en otras zonas, especialmente en hipocampo, también en el subículum y la corteza en general. También se encuentra la presencia de placas seniles (ver Figura I6a), miden 20 a 10 [μ]m y contienen proteína B amiloide. Pueden ser primitivas, difusas y las clásicas son las neuríticas. Estas últimas característicamente contienen: al centro proteína [b] amiloide, relacionada a la producción de angiopatía amiloidea y en la periferia está constituida por astrocitos reactivos, microglías, neuritas distróficas, componente inflamatorio y apolipoproteína E. La mayor densidad de placas neuríticas se observa en los lóbulos temporal y occipital (Braak y Braak, 1991).

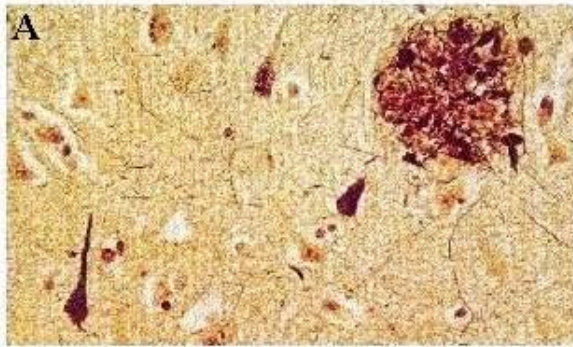
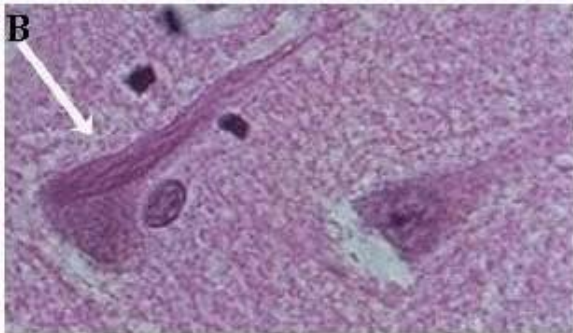


Figura 16.- Estructuras anómalas de la demencia de Alzheimer.

(6a) Placa amiloide de forma redondeada en el hipocampo (región cerebral vinculada a la memoria) de un paciente con Alzheimer. Las placas contienen proteína amiloide (anormal) y acetilcolinesterasa. Las estructuras oscuras y triangulares son neuronas en degeneración, conteniendo ovillos neurofibrilares.



(6b) Ovillo neurofibrilar, típico del Alzheimer, en el interior de una neurona. Aparece como una acumulación de filamentos en el citoplasma. Resulta de una desorganización del esqueleto celular por presencia de proteínas anormales.

No obstante, numerosos estudios neuropatológicos han documentado la presencia de placas seniles y marañas neurofibrilares en individuos ancianos no demenciados, en densidades aproximadas a las que se han encontrado en individuos dementes (Goldman et al., 2001). Mientras estos hechos reflejan que los cambios neurológicos que acompañan la enfermedad en realidad pueden ser características propias del envejecimiento del cerebro normal, algunos ancianos se han diagnosticado como preclínicamente enfermos de Alzheimer, por lo que el énfasis recae aquí en la potencialidad de que estos individuos generen eventualmente la enfermedad, a través del progreso en las condiciones fisiológicas del proceso de envejecimiento (Guillozet et al., 2003).

Lo mismo sucede con individuos que muestran problemas cognoscitivos que no son típicos del envejecimiento normal, y aunque no son aun diagnosticados como demenciados se les sitúa dentro de una zona transitoria entre la demencia y la vejez normal, lo cual se ha denominado daño cognoscitivo suave (Petersen, 1999). Lo que se hace manifiesto con esto, es que los estados cerebrales mórbidos que atañen a la eficiencia del aprendizaje y la memoria no pueden ser destacados como entidades tajantemente distinguidas de los procesos fisiológicos sanos, por el contrario existen elementos similares entre los cambios de un envejecimiento neuronal sano y uno enfermo, habiendo por tanto una serie de matices en cuanto al grado de rendimiento cognoscitivo.

La identificación de determinadas características que se manifiestan claramente en procesos patológicos neuronales, puede resultar pistas claves para la distinción entre un proceso de envejecimiento normal y uno anormal. Uno de estos factores comunes en la patogénesis de muchas enfermedades del sistema nervioso central, es la inflamación atípica que ocurre en ausencia de infiltración de leucocitos, ésta es una reacción que se presenta en padecimientos neurodegenerativos tales como el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Perry et al., 2002).

La convergencia de líneas de investigación respecto a estas enfermedades neurodegenerativas reveló la evidencia que muestra la agregación de la producción de óxido. Esto es congruente con el conocimiento que se tiene y sugiere que la causa directa de la inflamación constituye la acción de los residentes locales adyacentes al tejido neuronal, esto es, las células gliales, en especial la microglía. Estas células, además de fungir como macrófagos del sistema nervioso central, producen antígenos junto con la manifestación de señales estimuladoras que despliegan una asistencia inmunitaria adaptativa. Las tareas que realizan son indispensables para el funcionamiento y desarrollo propio del sistema nervioso central, empero la examinación histológica en escenarios neuropatológicos revela que la activación microglial demuestra tener un profundo potencial neurotóxico. Tal activación se mostró contribuyendo, agravando, o simplemente iniciando procesos destructivos (Rossum y Hanisch, 2004).

Una mayor comprensión de los procesos neurobiológicos que están detrás de la neurodegeneración propia de este tipo de enfermedades llevará al desarrollo de farmacoterapias neuroprotectoras eficaces y, recíprocamente, estas terapias aportarán evidencia de las causas que contribuyen a la patología neurodegenerativa. De acuerdo con esta aproximación, varios estudios han confirmado el papel de la neuroinflamación en la patogénesis de la EA gracias al hecho de que la terapia anti-inflamatoria crónica, con medicamentos como los ibuprofenos y otros anti-inflamatorios, puede proveer neuroprotección para los procesos neuronales que propician tal padecimiento (Aisen y Davis, 1994).

5. La Neuroinflamación

Dado que la neuroinflamación crónica contribuye a los problemas neurológicos a largo plazo que ocurren en las funciones cerebrales superiores afectadas por enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Akiyama et al., 2000) y que durante las etapas tempranas de estas enfermedades el grado más grande de neuroinflamación se encuentra en regiones involucradas en el aprendizaje y la memoria (Cagnin et al., 2001), es de bastante provecho indagar la naturaleza de esta reacción inflamatoria.

La inflamación central crónica que sigue a una afección cerebral traumática puede producir distrofia argirofílica en células dentro de regiones del hipocampo como el giro dentado, CA3, CA1, así como en la amígdala, la corteza entorrinal y piriforme (Colicos et al., 1996). Se cree que son estas regiones del lóbulo temporal las que están asociadas con la astrogliosis extensiva, la activación microglial en niveles potencialmente citotóxicos de IL-1 β y la manifestación de células moribundas argirofílicas. La pérdida consecuente de células hipocámpicas puede dañar la memoria espacial en una variedad de tareas.

Consistente con esto, es el reporte de que la administración unilateral crónica de IL-2 por 14 días dentro del ventrículo lateral produce un daño transitorio de la ejecución en el laberinto de agua de Morris, alteraciones en los receptores a la acetilcolina y a la dopamina en la corteza y en la región hipocámpica de CA1, gliosis reactiva, demielinación periventricular ipsilateral a la infusión y una pérdida neuronal modesta en la corteza parietal y el área septal (Hanisch et al., 1995).

La vulnerabilidad selectiva que parecen manifestar las estructuras del lóbulo temporal y la amplia respuesta inflamatoria dentro de la región del cerebro anterior, podría explicar como estas regiones muestran extensos cambios patológicos, en los que se incluyen pérdida celular, incremento de placas y formación de marañas proteínicas, tales como los que se dan en pacientes con Alzheimer (Price y Morris, 2004).

Esta enfermedad está asociada con un incremento en los niveles de la interleucina 1-alfa (IL-1 α), una citocina inflamatoria del cerebro (Griffin et al., 1998). La elevación de esta citocina puede subyacer y a la vez deberse a la extensión de la astrogliosis característica de dicho padecimiento. Así mismo, la IL-1 α puede inducir la expresión del precursor del gen de la β -amiloide, así como la expresión de la S100 β y la apolipoproteína E (ApoE) en astrocitos. Las placas neuríticas contienen tanto β -amiloide como células microgliales reactivas que sobre-expresan citocinas proinflamatorias, incluyendo la IL-1 α y el factor alfa de necrosis tumoral (FNT α) (Mrack et al., 2005).

En un cerebro saludable, la microglía se presenta en un estado regulado comparado con el que se da en otros tejidos macrófagos, empero, una sutil alteración microambiental puede inducir en estas células una rápida reactivación (ver Figura 17) la cual hace que adquieran cambios morfológicos así como un orden de funciones incluyendo la fagocitosis y la secreción de mediadores inflamatorios (Perry, 2004). Cuando existen amenazas contra el SNC la respuesta microglial juega un papel fundamental en la defensa de la homeostasis necesaria para las funciones de las neuronas, sin embargo, este mecanismo que en principio es benéfico para el organismo, si alcanza un punto crítico, puede degenerar en una condición contraproducente vinculada con una excitación crónica perjudicial.

La habilidad de la microglía para prevenir un peor daño neuronal es altamente dependiente de una intercomunicación y un determinado balance entre las microglías y las neuronas. En un estado saludable las neuronas participan en el control de la amplitud y duración de la activación microglial (Polazzi et al., 2002), el daño relacionado con el envejecimiento en las funciones neuronales es probablemente porque las neuronas, en el cerebro envejecido, en lugar de detener tal actividad microglial contribuyen a su activación.

Una evidencia congruente con esto, es que la adición de células neuronales en procesos de apoptosis en un cultivo de microglía, decreta la secreción de citocinas proinflamatorias y promueve la liberación de otras moléculas, tales como el factor de crecimiento nervioso, sugiriendo que la

fagocitosis de neuronas apoptóticas estimula específicamente, en una respuesta que involucra a las neuronas, a células microgliales para adquirir un fenotipo anti-inflamatorio (De Simone et al., 2003).

Esto indica que la activación microglial se puede dar en un estado que coadyuva a la neuroinflamación o puede darse, al contrario, con un carácter anti-inflamatorio, según los diversos factores nerviosos que estén incidiendo.

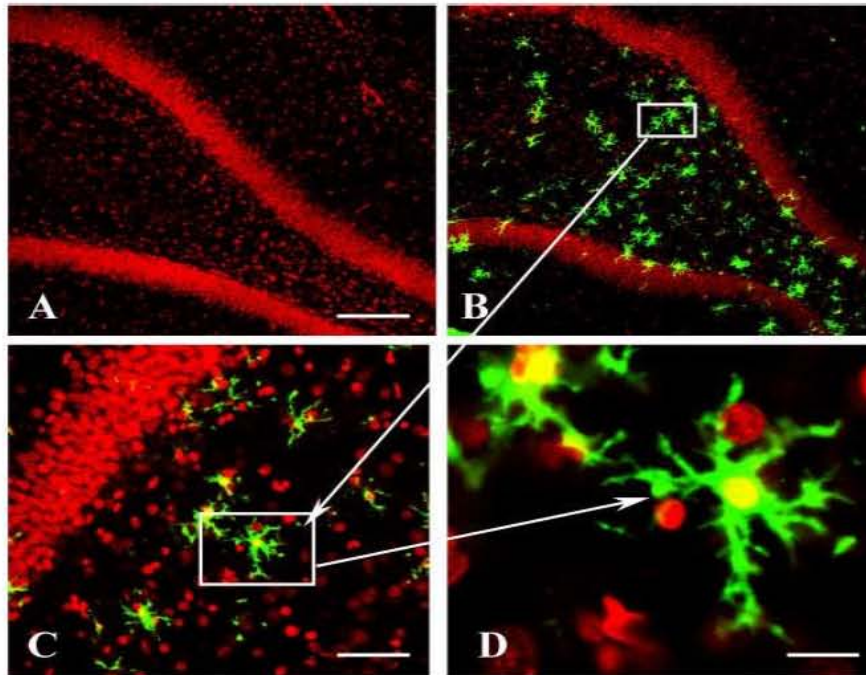


Figura 17.- Imágenes de células microgliales activadas MHC II (se observa en verde la detección de la OX-6,) en el giro dentado, tomadas con microscopía confocal. En el recuadro (A) se observan tejidos de ratas tratadas con fluido cerebroespinal artificial (FCEa), muestran una muy escasa actividad glial esparcida por todo el cerebro. La administración crónica de lipopolisacárido (LPS) dentro del cuarto ventrículo produce una activación alta de la microglía a lo largo del hipocampo (B). La amplitud alta de la activación microglial (C, D) mostró una tupida morfología característica, con un incremento en el tamaño de los cuerpos celulares, los cuales se observaban contraídos y con procesos de ramificación. El núcleo de las células se distingue en rojo y fue tenido con ToPro3 (Molecular Probes) Escala de las barras: (A-B) 100 μm ; (C) 25 μm ; (D) 2.5 μm .

Se ha observado que una activación de la microglía con un perfil anti-inflamatorio, se puede tornar en un estado agresivo de proinflamación celular cuando en ratones con enfermedad de prion se pone a prueba una dosis de LPS para imitar una infección sistémica (Combrinck et al., 2002). Una inflamación de este tipo, por lo tanto, puede desencadenar funciones proinflamatorias por parte de las microglías activadas, lo cual sienta una base para los procesos

neurodegenerativos. Acorde con esta hipótesis, el incremento en los niveles de moléculas proinflamatorias en cerebros de personas afectadas por la enfermedad de Alzheimer puede estar relacionado con infecciones sistémicas, lo cual frecuentemente ocurre en estos pacientes, contribuyendo así al progreso de esta enfermedad (Perry, VH. 2004).

La ausencia de inflamación o la desinflamación de un tejido es, por tanto, la consecuencia de un proceso complejo que incluye productos genéticos, liberación de factores estimuladores y de respuestas que estos generan sobre receptores específicos, suprimiendo o promoviendo reacciones con el objeto de mantener un estado necesario para la supervivencia del organismo. El sistema nervioso mantiene un alto control sobre la inflamación periférica por medio del sistema nervioso vegetativo. Las condiciones inflamatorias activan vías sensoriales que conducen información hacia el hipotálamo; los estímulos inflamatorios, en condiciones cerebrales saludables, generan un reflejo y activan una respuesta anti-inflamatoria.

A pesar de los crecientes avances en la comprensión de las enfermedades neurodegenerativas, continua el debate acerca del rol que juega la inflamación en estas. Algunas hipótesis han propuesto que la deposición extracelular de β -amiloide y su agregación dentro de la fibrillas puede ser un evento primario en la patogénesis de la EA (Hardy y Higgins, 1992). La presencia de las fibrillas de β -amiloide puede causar reactividad microglial para la liberación de radicales superoxidativos tóxicos, como una cantidad de citocinas citotóxicas y varios componentes de las placas seniles tales como la ApoE y la S100 β . Así mismo, la elevación crónica de la interleucina 1 (IL-1) puede conducir a una cascada autopropagatoria de eventos celulares a través del cerebro que, junto con un proceso de inflamación crónica, son capaces para producir la deposición de β -amiloide, la formación de placas y la muerte regional neuronal (Mrack et al., 1995).

A partir de lo anterior, es claro que existe una íntima relación entre los procesos adversos y benéficos de la neuroinflamación, relación que probablemente varía su carácter de acuerdo a la progresión de la enfermedad.

Un profundo conocimiento de la biología de las células microgliales, así como el avance de modelos in-vivo e in-vitro que repliquen las características relevantes de las enfermedades crónico degenerativas, será por tanto crucial en el desarrollo efectivo de tratamientos para estos desordenes neurológicos.

De igual manera, herramientas importantes resultarán de la identificación de biomarcadores relacionados con estas enfermedades o con la neuroinflamación, lo cual además puede ser de gran ayuda para evaluar el estado específico en que se encuentra la enfermedad y monitorear la eficacia clínica de los tratamientos con medicamentos (Minghetti, 2005).

Puesto que no se puede intervenir quirúrgicamente el cerebro de un hombre que tenga neuroinflamación para observar los cambios metabólicos anormales que se presentan, se han diseñado modelos animales que buscan emular este padecimiento con el propósito de estudiar más a fondo y con mayor libertad de intervención este tipo de reacción. Los primeros modelos animales se habían enfocado en las consecuencias de la pérdida de células colinérgicas dentro del cerebro anterior basal, lo cual es a menudo visto en la EA. Un decline en el número, tamaño o función de las células colinérgicas en el cerebro anterior, puede ser responsable para algunos de los daños cognoscitivos asociados con el envejecimiento y la EA en humanos.

Más recientemente uno de los modelos más exitoso ha sido el de la neuroinflamación crónica inducida experimentalmente (Hausse-Wegrzyniak et al., 1998). Este consiste en la administración intracerebroventricular de LPS (lipo polisacárido) por medio de cánulas colocadas en los ventrículos laterales y conectados a una bomba Alzet (Bomba de infusión crónica con flujo constante) que libera a una tasa fija la solución con LPS en el líquido cefalorraquídeo. El LPS es considerado un superantígeno que al ser administrado en el cerebro induce inflamación del tejido nervioso, mediado por la activación selectiva de la microglía dentro del hipocampo y la corteza entorrinal, regiones cerebrales involucradas en el aprendizaje y la memoria (Hausse-Wegrzyniak et al., 1998; Rosi et al., 2004). El LPS se usa experimentalmente para simular la producción endógena del precursor de la proteína β -amiloide y de la IL-1. La microglía

activada es la principal fuente de IL-1 después de una inyección de lipopolisacárido y sirve como un importante intermediario de los efectos del LPS en el cuerpo ya que puede participar, por medio de la actividad de los astrocitos, para la producción de otras citocinas. Con este modelo se corrobora que las fibrillas amiloideas y los lipopolisacáridos parecen participar de receptores y cascadas de señalamiento intracelular proinflamatorios (Fassbender et al., 2004)

Otra evidencia es que la estimulación de un cultivo de microglía con lipopolisacáridos o péptidos fibrilogenéticos desencadena la síntesis regulada de distintos mediadores, incluyendo moléculas proinflamatorias. El periodo relativamente corto de estimulación y la adición abrupta de agentes, manifiesta una semejanza con la lenta constitución de los depósitos amiloideos que se da en un cerebro en vivo. La activación persistente de un cultivo de microglía de rata con LPS induce alteraciones significativas en los mecanismos secundarios de la red de señalamiento de los recetores al LPS (Minghetti, 2005).

La neuroinflamación, al igual que en los pacientes con Alzheimer, cuando se induce experimentalmente en animales jóvenes, como en este caso ratas, produce deterioro cognoscitivo, cambios patológicos conductuales y bioquímicos semejante a los observados en dicho padecimiento (Haus-Wegrzyniak, 1998; 2002). Algunos de estos cambios incluyen memoria espacial dañada, inducción dañada de potenciación a largo plazo, reducción de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), astrocitosis, citocinas elevadas y factores de transcripción proinflamatorios (Haus-Wegrzyniak et al., 1998, 2002; Rosi et al., 2003, 2004). Este modelo aporta un medio útil para reproducir la neuroinflamación de manera controlada, de tal forma que se puede inducir la condición patológica en distintos periodos de su avance y así corroborar los cambios que estos implican en un determinado momento.

En suma, pese a que el modelo de neuroinflamación con LPS no reproduce exactamente las características patológicas de la enfermedad de Alzheimer, si lo hace con algunas como las siguientes: un proceso de inflamación global crónico asociado con un incremento en la activación de microglías y astrocitos, un incremento en los tejidos de IL-1 y FNTa, una

patología del lóbulo temporal asociada con pérdida celular, un incremento de microglía reactiva y, consecuentemente con todo esto, problemas en la memoria espacial y de trabajo (Hausse-Wegrzyniak et al., 1998).

Puesto que la neuroinflamación inducida con LPS es un modelo de neurodegeneración que induce discapacidad cognoscitiva, es imprescindible entender la fisiología que subyace a las alteraciones que ocurren en la función neuronal. Una estrategia es evaluar las posibles modificaciones en la respuesta neuronal ante la estimulación conductual, para ello una herramienta útil es la identificación de las células que responden a la conducta utilizando el método de catFISH; con el objeto indagar sobre la alteración que la neuroinflamación produce sobre la activación y la articulación de los ensambles de representación mnémica.

Investigaciones previas demostraron que en animales con neuroinflamación crónica inducida por la administración de LPS durante 15 días, la expresión tanto del ARNm de Arc como de su proteína ocurre en un número mayor de células en comparación con un cerebro no inflamado. Lo que llama la atención, es que este incremento en el número de células que expresa Arc ocurre principalmente en el giro dentado y en la región de CA3 del hipocampo, pero no en CA1. Lo que correlaciona con el hecho de que estas regiones son las que presentan un mayor número de células microgliales activadas, medido con la detección de OX6, lo que se usa como un indicador de neuroinflamación (Rosi et al., 2005). La neuroinflamación crónica no parece afectar globalmente la expresión de Arc, por el contrario, el incremento ocurre solamente en el número de células que responden a la conducta.

Estos datos revelan una alteración de la respuesta de células hipocampales ante la exploración cuando se está bajo un proceso de neuroinflamación. Pero aun permanecen muchas preguntas sin resolver, por ejemplo: cómo es que este incremento en la respuesta puede explicar el deterioro cognoscitivo y qué mecanismo determina el incremento de la expresión de Arc en las células hipocampales.

Es posible que tal aumento en la respuesta de Arc inducida por exploración en animales con neuroinflamación, pueda resultar de una secuencia de procesos bioquímicos iniciados por la activación de las células microgliales. La elevación crónica de citocinas proinflamatorias y de óxido nítrico conduce a una cascada de eventos celulares autopropagatorios, incluyendo un bloqueo de la recaptación de glutamato por la glía, incrementos en la síntesis y liberación de prostaglandinas, un aumento en la liberación de glutamato de los astrocitos y, en consecuencia, una alteración en la actividad fisiológica del hipocampo (Griffin et al., 1998).

Se piensa que un incremento en la respuesta da lugar a ensamblajes plásticos menos finos y por lo tanto con mayor interferencia entre diferentes representaciones mnémicas, en suma, esta alteración disminuye la eficiencia mnémica del sistema hipocampal (Sakurai, 1999). El mecanismo que determina tal disfunción al parecer está mediado por una mayor cantidad de glutamato en el espacio sináptico causado por la activación de la microglía. Además, durante la inflamación crónica en el SNC una proporción significativa de canales NMDA puede existir sin el bloqueo de magnesio, resultando en una entrada incrementada de calcio en la postsinapsis (Brown y Bal-Price, 2003), aunado a que los grados elevados de proteínas inflamatorias también pueden incrementar indirectamente los niveles de calcio intracelular a través de los canales NMDA (Viviani et al., 2003).

Bajo estas condiciones cualquier actividad sináptica glutamatérgica adicional permitiría un influjo continuo de iones de calcio dentro de las neuronas, sobrecargando los mecanismos endógenos que regulan la homeostasis de los iones de calcio y llevando a una muerte celular a largo plazo (Albin y Greenamyre, 1992). Lo cual denota que el umbral de activación de la célula y el de la transcripción de Arc se encuentran alterados (Rosi et al., 2005), lo que contribuye al deterioro cognoscitivo asociado a la neuroinflamación y posiblemente a otros padecimientos neurodegenerativos como el Alzheimer.

6. El Efecto de la Memantina

Distintos procesos neuroquímicos pueden mediar el almacenamiento de la memoria en diferentes periodos temporales. De aquí el concepto de los procesos neuroquímicos secuenciales para la formación de memoria, de tal manera que el mismo agente químico o farmacológico puede ayudar para la formación de memoria bajo determinadas condiciones, pero alterarlo en otra. (Rosenzweig 2004). Este es el caso con los procesos mediados por los receptores ionotrópicos glutamatérgicos que, pese a que están involucrados en la transmisión sináptica excitatoria y en la plasticidad sináptica, la sobre activación puede llevar a alteraciones, las cuales están implicadas en la patogénesis de la neurodegeneración que ocurre en varios desordenes agudos y crónicos del SNC. Se sabe que en estas enfermedades la excesiva estimulación de los receptores al glutamato puede ocurrir, incluso, en ausencia de niveles excesivos de este neurotransmisor. Así, aunque cada enfermedad esta causada por diferentes mecanismos, estos al final confluyen en un camino similar para la inducir daño neuronal debido a la sobre-estimulación de los receptores glutamatérgicos; por lo que este fenómeno patológico, conocido como excitotoxicidad, representa un objetivo potencial, particularmente relevante, para los esfuerzos neuroprotectivos (Lipton A, 2006).

Los receptores NMDA se componen por diferentes subunidades: la NR1 (que tiene una presencia predominante), los NR2A-D y, en algunos casos, los NR3A o NR3B. El receptor esta probablemente compuesto por un tetrámero de estas subunidades. La composición de la subunidad determina la farmacología y otros parámetros del canal iónico completo del receptor. Las subunidades están diferenciadas en el cerebro tanto regionalmente como temporalmente a lo largo del desarrollo.

Durante la neurotransmisión normal el canal del receptor NMDA es activado por solo un breve periodo de tiempo debido al destape del bloqueo de magnesio, lo cual ocurre después del influjo de cationes dentro de la neurona por medio de los canales del receptor al glutamato tipo AMPA. La activación

regulada de los receptores NMDA esta involucrada en mecanismos vitales para el organismo, por ejemplo, el sistema de la formación reticular del tallo cerebral, responsable del despertar cortical y la atención, contiene una gran cantidad de estos, de tal manera que si no funcionan normalmente pueden llevar al individuo hasta un estado de coma. Por tanto, es de primordial importancia preservar la fisiología normal de estos receptores con el objeto de mantener la homeostasis y evitar los efectos colaterales de su supresión abrupta. El problema, como vemos, radica en que el mismo mecanismo que provoca la excitotoxicidad es, en niveles más bajos, necesario para el funcionamiento normal de los procesos neuronales. Esto hace que la mayoría de fármacos bloqueantes de los receptores NMDA tengan graves efectos colaterales y sean por consiguiente clínicamente intolerables (Lipton A, 2006).

Los recientes avances en el entendimiento de la función farmacológica, genética y estructural de los receptores NMDA, ha promovido una búsqueda de nuevos componentes que se puedan usar terapéuticamente. Estos componentes pueden actuar en el mismo sitio del ligando natural o en otras regiones del receptor, incluso directamente dentro del poro del canal iónico, miembros del último grupo se les llama bloqueadores del canal abierto. Así, algunos antagonistas del receptor al glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato) tienen un potencial terapéutico extenso sobre algunos desórdenes del sistema nervioso central, haciéndose viable su uso en enfermedades neurodegenerativas y en otras enfermedades crónicas tales como la epilepsia.

La memantina representa una clase de bloqueador de canal abierto de relativamente baja afinidad, esto significa que esta droga solo entra al canal cuando este ya está abierto por un agonista. Por esto la memantina, en dosis terapéuticas, bloquea el canal cuando este se encuentra activado patológicamente por largos periodos de tiempo, como cuando se halla expuesto a condiciones excesivas de glutamato. En el momento en que el sistema vuelve más o menos a sus condiciones normales de excitación, la memantina pierde, relativamente, la capacidad para bloquear los canales del NMDA, con lo cual no interfiere con las funciones que estos desempeñan.

Esta cinética de baja afinidad con respecto al canal, hace de este fármaco un neuroprotector eficaz con mínimos efectos adversos (Lipton A, 2006). Lo que se ha constatado por la evidencia de que su acción no suprime la potenciación a largo plazo medida conductualmente por la ejecución en el laberinto de agua de Morris. Preservando la actividad sináptica dentro de un rango que mantiene los niveles de salud cerebral, evita, a su vez, daños graves que están asociados con la acción de otros antagonistas del receptor NMDA, tales como la vacuolarización de las neuronas cinguladas adultas y la apoptosis de neuronas perinatales (Chen, et al 1998)

Se piensa que la memantina ejerce sus efectos sobre los receptores NMDA a través de bloquear un lugar cercano o el mismo sitio del magnesio dentro del canal iónico. Así mismo, su eficacia bloqueadora se abarca todos los tipos de canales operados por receptores NMDA que se componen de la subunidad NR1 y varios que tienen la NR2. El hecho de que la memantina sea eficaz por el bloqueo que realiza sobre el sitio del magnesio a través de interactuar, preferentemente, con la subunidad NR1, junto con el dato de su característica cinética de baja afinidad, parece sugerir que este fármaco bloquea la actividad de los receptores NMDA cuando el canal iónico está excesivamente abierto.

Por esto, la memantina es la única droga antigitamatérgica actualmente aprobada para el tratamiento del Alzheimer moderado a severo. Algunos estudios han demostrado que el tratamiento con memantina tiene beneficios funcionales y cognoscitivos a través de todas las etapas de la enfermedad, además de ser seguro y bien tolerado. Este fármaco puede ayudar a las personas con la enfermedad de Alzheimer a pensar más claramente y realizar las actividades diarias más fácilmente, pero no es una curación y no detiene la progresión de la enfermedad. Adicionalmente, genera un efecto positivo indirecto sobre el cuidado del enfermo, que resulta en algunos beneficios sociales. Este hecho, junto con un retraso en la transición hacia una etapa de dependencia mas grande está probablemente asociado con la disminución en el número de pacientes hospitalizados (Molinuevo J., Lado A., 2005).

Entre los estudios realizados con este fármaco, se realizó uno con personas que padecen demencia, estratificando en un primer análisis a los pacientes según la severidad o el avance que este padecimiento había alcanzado en estos. Se probó el efecto de un placebo comparándolo con una dosis diaria de 10mg. de memantina y se descubrió una diferencia significativa entre los dos grupos después de 28 semanas. La memantina fue superior, respecto a su efecto terapéutico, en todos los grupos con relación al placebo, siendo en los grupos con daño más severo en los que el efecto se mostró más pronunciado (Mobius H. J, Stoffer A).

Por otro lado, se conoce que el glutamato se acumula en abundancia durante el periodo temprano del hematoma experimental, con lo cual la activación de los receptores NMDA puede resultar en un influxo continuo de calcio y muerte neuronal en casos de hemorragia intracerebral. Con base en esto, se ha investigado la memantina con respecto a su habilidad para bloquear la sobre-estimulación del glutamato, descubriendo que el volumen de la hemorragia decremente al 47% en un grupo tratado con memantina comparado contra un grupo placebo. En consecuencia este estudio muestra que dicho fármaco causa una reducción de la expansión del hematoma, además de que reduce la infiltración inflamatoria y la apoptosis induciendo recuperación funcional después de la hemorragia intracerebral (Lee S.T et al., 2005).

En el presente estudio queremos generar mas evidencia que nos permita entender los substratos neuronales del declinamiento cognoscitivo asociado a la neuroinflamación y a padecimientos en donde esta se presenta, tales como el Alzheimer. Cómo el Arc, de ser un gen relacionado con proteínas del citoesqueleto, que participa en las funciones de plasticidad cerebral, puede repercutir en un efecto contrario adverso debido a la inflamación neuronal. Trataremos de aportar datos experimentales que ayuden a comprender la distribución de las funciones sostenidas por regiones específicas hipocampales, la distinción de su susceptibilidad al daño inflamatorio y su respuesta ante un fármaco que atempera sus repercusiones (en este caso la memantina). Con base en esto, se pretende observar si la reducción de la neuroinflamación

reestablece la respuesta hipocámpica normal, medida conductualmente por la ejecución en el laberinto de agua de Morris y, fisiológicamente, por la expresión de Arc; o si, por el contrario, la incidencia del daño inflamatorio deja repercusiones que no permiten que se recupere la función hipocámpica eficiente.

Planteamiento del problema

Si el funcionamiento hipocámpico se ve alterado por la neuroinflamación, repercutiendo esta en la capacidad de los animales para aprender y memorizar, lo cual se observa, conductualmente, por las deficiencias que estos muestran en el laberinto de agua de Morris y, fisiológicamente, por la sobre-expresión del gen Arc, ¿se restablecerá las funciones normales del hipocampo si se trata a los animales con un antagonista no competitivo de canal abierto del receptor NMDA, como en este caso la memantina?

Objetivos

General.

Entender algunos de los mecanismos celulares que subyacen las alteraciones en la función neuronal asociados a padecimientos neurodegenerativos que producen deterioro cognoscitivo, para determinar si un tratamiento farmacológico útil para estos padecimientos corrige las alteraciones en la función neuronal y/o el problema cognoscitivo asociado.

Particular.

Estudiar el efecto de la memantina (que disminuye la sobreactivación del receptor NMDA y se utiliza en el tratamiento de Alzheimer) sobre la respuesta hipocámpica a la conducta de exploración alterada por la administración crónica de LPS; esto es, observar el efecto de la memantina sobre la neuroinflamación

que el LPS induce en el giro dentado y la región de CA3 del hipocampo, cuando estas estructuras están involucradas en una tarea de exploración espacial.

Variables

Independientes

- Administración crónica de LPS
- Administración crónica de LPS y memantina

Dependientes

- Ejecución en el laberinto de agua de Morris
- Proporción de células que expresan el gen Arc en el hipocampo
- Cantidad de microglía activada

Hipótesis

Pensamos que si en la presencia de la neuroinflamación crónica, la pérdida de los patrones de actividad asociados con la neuroplasticidad y la memoria depende de la sobreactivación de los receptores NMDA y la entrada incrementada de los iones de calcio, luego entonces, el tratamiento con un modulador del receptor a glutamato tipo NMDA, como la memantina, deberá atenuar significativamente las alteraciones en la respuesta de células hipocampales a la conducta y posiblemente mejore la ejecución de los animales en una tarea espacial.

MÉTODO

Sujetos y procedimientos quirúrgicos.

Los sujetos utilizados fueron 44 ratas macho de la cepa F-344 (Harlan Sprague-Dawley, Indianápolis, IN), con tres meses de edad, confinadas individualmente con agua y alimento libremente disponible. El fluido cerebroespinal artificial (FCEa n=12) o el lipopolisacárido (n=32) se administraron a través de una cánula implantada dentro del cuarto ventrículo. Éstas cánulas se implantaron por medio de cirugía estereotáxica y estaban conectadas a una minibomba osmótica (modelo Alzet # 2004 para distribuir 0.25 ml/h) (Hausse-Wegrzyniak et al., 1998, 2000, Rosi et al., 2003, 2004, 2005), con las cuales se administró el LPS, intraventricularmente, o la memantina, subcutáneamente, según fuera el caso (los animales con LPS y Memantina tendrán 2 bombas conectadas cada una a una cánula independiente). Estas minibombas mantienen una tasa constante de liberación de la droga en la zona en donde se coloque la cánula.

Grupos.

Se trató crónicamente durante 29 días con fluido cerebroespinal artificial (FCEa) a 12 individuos, este funcionó como vehículo y contiene (en mM) 140 NaCl; 3.0 KCl; 2.5 CaCl₂; 1.0 MgCl₂; 1.2 Na₂HPO₄ ajustado para un pH 7.4. A los 32 individuos restantes se les administró, durante el mismo periodo, lipopolisacárido (LPS, sigma, E. coli, serotipo 055:B5, TCA extracción, 1.0 mg/ml disuelto en FCEa). En el mismo día una minibomba osmótica que liberaba memantina de manera subcutánea (a razón de 10mg/Kg/día) fue insertada en la espalda de 17 ratas del grupo tratado con LPS.

Para evaluar cognoscitivamente a los animales se les entreno en la tarea de laberinto de agua de Morris, y cuatro días después se expusieron a una tarea de exploración simple para inducir la expresión de Arc en el hipocampo y evaluar la respuesta celular. De esta manera cada rata fue asignada para uno de dos grupos: grupo de exploración espacial (tratados con LPS- (n=12),

LPS+memantina (n=12) y FCEa (n=10) o animales control enjaulados (LPS (n=3) LPS+memantina (n=5) y FCEa (n=2)

Procedimientos conductuales.

Manipulación: Las ratas fueron manipuladas diariamente antes de someterlas a las tareas conductuales: 4 días antes del laberinto de agua y 4 antes de la exploración del ambiente (ver diagrama de flujo). La manipulación consiste en tomar al animal en los brazos, envolverlo en una toalla seca, y acariciarlo por un intervalo de aproximadamente 5 minutos. El objeto de esta manipulación es que se acostumbren al contacto con el investigador, lo que ayuda a reducir el estrés y disminuir la expresión de Arc asociada al contacto del animal con el investigador.



Diagrama de flujo que esquematiza la secuencia de los procedimientos experimentales.

Laberinto de Agua: Con el objetivo de evaluar la habilidad de aprendizaje espacial de las ratas, se midió la ejecución de los animales en el laberinto de agua de Morris. Luego de tres semanas de que se les aplicaran los procedimientos quirúrgicos, se llevó a cabo la adquisición de una tarea espacial en el laberinto de agua de Morris. Esta prueba consiste en un tanque de una profundidad de 80cm. con un diámetro de 185cm. Se coloca al animal en uno de diferentes puntos de salida y se le dan 60 segundos para llegar a la plataforma, si no llegan se les guía manualmente. La rata es un animal terrestre e instintivamente le tiene aversión al agua, por ello la plataforma de escape funciona como un reforzador negativo; de tal manera que al repetirse la tarea, la llegada a la plataforma, refuerza las conductas de navegación espacial que le permiten al animal disminuir progresivamente el tiempo de llegada. La plataforma circular de escape se encontraba 1cm. por debajo de la superficie del agua y fue puesta siempre en un lugar constante.

El recorrido de las ratas fue registrado por una cámara de video situada por encima del estanque de agua conectada a un VP114 de recorrido unitario (HVS Image, England). Un software Custom (TR, J. Forster: WMAZE.M. Williams) fue usado para almacenar, reconstruir y analizar la latencia de la llegada a la plataforma para cada ensayo. Todas las ratas realizaron tres bloques de recorrido por día (cada bloque se componía por dos recorridos) a lo largo de 4 días (haciendo un total de 24 recorridos), depositando a la rata en un lugar que variaba al azar de una prueba a otra. Entre cada ensayo se permitía descansar a los animales por un periodo de sesenta segundos, 30 seg. en la plataforma de llegada y otros 30 en su caja de descanso, así mismo, entre cada bloque de entrenamiento se permitía descansar a los animales un periodo de 30 a 60 min. Para saber sobre posibles deficiencias en la agudeza visual y en la forma de nado relacionados con la memantina o el LPS, en el cuarto día las ratas fueron sometidas también a una segunda versión de esta tarea, en la cual se movió al azar una plataforma visible (2cm. por encima del agua) para una de cuatro locaciones del tanque. Todos los animales realizaron sucesivamente un total de

6 recorridos con plataforma visible. Estos resultados no se muestran abajo ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Exploración: Con el objetivo de estimular la actividad de las células hipocámpicas para después identificar las células activadas por medio de la detección de la expresión de Arc, se colocó a los animales del grupo de exploración espacial dentro de un ambiente durante cinco minutos. El ambiente de exploración fue una caja cuadrada abierta de 61x61cm con 20cm de altura dividida en el interior en 9 espacios iguales delimitados con pintura en la base de la caja. Cada rata fue colocada en el cuadrante central y cada 15 seg era movida a un nuevo cuadrante bajo un programa semi-aleatorio, esto se hizo durante 5 minutos, de tal manera que los animales visitaron cada cuadrante entre 2 o 3 veces. Esto se hizo con el objeto de que todos los animales recorrieran completamente el espacio de exploración. Se ha demostrado que la exploración forzada como la usamos nosotros, induce actividad en el mismo número de células que la exploración libre, siendo un poco menos variable la exploración forzada. Inmediatamente después de la exploración, los animales fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros fueron rápida y cuidadosamente extraídos (entre 160 y 200 seg.) y congelados a -70°C en una solución de isopentano colocada en hielo seco. Las ratas que no fueron introducidas en el ambiente de exploración fueron sacrificadas del mismo modo e intercaladas temporalmente con el sacrificio de las ratas que si exploraron.

Bloqueo de cerebros y Criosección.

Los cerebros fueron cortados a la mitad de la línea media sagital y en el hemisferio seleccionado para el bloque se cortaba a la altura del cerebelo y se removía la región frontal. De esta manera cada hemisferio fue colocado en un molde de plástico en donde un hemisferio de un animal de cada grupo fue incluido para ser bloqueado con OCT. De esta manera cada bloque contenía la mitad del cerebro de un animal de cada uno de los grupos. Se realizaron 6 bloques con 8 o 6 cerebros de los diferentes grupos cada uno.

Los bloques fueron cortados en un crióstato a -18°C en secciones de $20\mu\text{m}$ de grosor y montados en laminillas Super Frost (VWR). Las laminillas con las secciones de cerebro fueron almacenados a -70°C hasta ser procesados para una doble inmunohistoquímica o hibridación in situ.

Tinción inmunofluorescente.

Seis laminillas de la porción medial del hipocampo dorsal de todos los grupos fueron seleccionadas (antero-posterior, ≈ 3.6 mm. de Bregma) y la doble tinción para la microglía activada y la proteína Arc fue hecha de la siguiente manera: el tejido fue fijado en 2% de paraformaldeído, con un PH 7.4, por 5min, después se enjuagó en una dilución buffer de 2X SSC, con PH 7.0 (Sigma, St. Louis, MO), seguido por una incubación en 50:50% de acetona/metanol a 4°C por 5min. El resto de los enjuagues se hizo con 2X SSC más 0.05% de Tween 20. Se inactiva la peroxidasa endógena con 2X SSC + 3% H_2O_2 por 15 min. Se bloquea con buffer de bloqueo contenido en el kit de amplificación de TSA (PerkinElmer Life Sciences, Emeryville, CA), el que fue aplicado por 30min, seguido por la incubación en el anticuerpo anti-Arc policlonal de conejo (1:800, del laboratorio del Dr Worley) diluido en buffer de bloqueo.

Cuatro laminillas de cada condición fueron escogidas de la misma porción medial del hipocampo dorsal para la doble tinción de NMDAR1 y la microglía activada, cuatro más de NMDAR1 y astrocitos. Después de que los tejidos se procesaron de esta manera se dejaron en anticuerpo primario de ratón NMDAR1 monoclonal (Chemicon Internacional, Temecula, CA, USA) (dil 1:250) por 48hrs. de incubación a 4°C . Las secciones fueron entonces incubadas por 2hrs a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Vector Laboratories, Burlingame, CA), seguido por la incubación con el sistema de amplificación de biotina-avidina (Vector Laboratories) por 45 min. Antes de aplicarse el anticuerpo de rata biotinilado monoclonal secundario (Vector Laboratories) por 2hrs, el tejido fue incubado con un equipo bloqueante de biotina y avidina (Vector Laboratories) por 30min para bloquear la reacción que se dio con la tinción.

La tinción fue visualizada usando un sistema fluorescente TSA CY3 (PerkinElmer Life Sciences, Emeryville, CA). Después de lavarse en una solución TBS los tejidos fueron extraídos y bloqueados otra vez, siguiendo el procedimiento descrito arriba e incubados con el anticuerpo monoclonal OX-6 (PharMingen, San Diego, CA) en una dilución final (1:400). Después la tinción fue visualizada con un sistema CY5 de fluorescencia TSA (PerkinElmer Life Sciences) y el núcleo fue contrateñido con Sytox-Green (Sondas Moleculares, Eugene, Oregon). La inmunotinción simple para las células microgliales residentes fue desarrollada usando el anti-OX-42 de ratón anti-rata en dilución final de 1/400 (PharMigen, San Diego, California, USA). No se detectó tinción alguna en la ausencia de anticuerpos primarios o secundarios.

Hibridación in-situ con fluorescencia (FISH).

Se seleccionaron cinco cortes de la misma porción medial del hipocampo dorsal adyacente a los que se escogieron para inmunohistoquímica y se procesaron por hibridación in situ para detectar ARNm de Arc (Guzowski et al., 1999; Vazdarjanova et al., 2002). El tejido se fijo en 4% de paraformaldehído, se enjuago en 2XSSC y se colocó en una solución de acético-anhídrico, seguido por una incubación en acetona-metanol por 5 minutos. Después de un paso de prehibridación, el tejido es hibridizado con una sonda contra Arc (100ng/laminilla) marcada con digoxigenina y diluida en buffer de hibridación (Sigma. St Louis MO) durante 16-18hrs a una temperatura de 56 °C. Después de una serie de enjuagues, incluido un paso en el que se aplica RNasa A, para destruir la sonda y el RNA no hibridizado, las laminillas son incubadas por 24hrs en anticuerpo antidigoxigenina conjugado con peroxidasa (Roche Products, Hertfordshire, UK) a 4 °C. La tinción fue finalmente visualizada con el sistema de amplificación TSA usando Cy3 como fluorocromo. El núcleo se tiñó con Sitos-Green.

Adquisición de imagen (microscopía confocal)

Para poder definir las fronteras anatómicas y el grado de activación microglial dentro del hipocampo se tomaron dos secciones coronales del hipocampo dorsal que se reconstruyeron para cada animal de cada grupo de tratamiento. Los bloques de tejido en el plano Z se tomaron con un microscopio multifotónico-confocal equipado del que se utilizaron un láser de argón de 488 nm y un láser de helio/neón de 543nm y otro de 633nm (modelo Zeiss LSM 510 NLO-meta). Los parámetros de intensidad y contraste se acomodaron usando secciones laminares tomadas de una rata administrada con FCEa. Los parámetros se mantuvieron constantes en todas las secciones en un corte dado usando los dos láseres de 488nm para visualizar el Sytox-Green y el de 543nm para visualizar el CY3. Las muestras de imágenes fueron mantenidas en las siguientes coordenadas: CA3 anteroposterior, 3.8; lateral, 2.8-3.8; y dorsoventral, 3.8; y PCX anteroposterior, -3.8 a -4.2; lateral, 1.5-2.5; dorsoventral, 2.0; y la quinta capa cortical. Las imágenes fueron tomadas con un pequeño traslape y la forma de los cuerpos celulares fue usada como una referencia para la alineación. Dos de las tres laminillas teñidas por cada bloque (de los métodos de inmunofluorescencia e hibridación in situ) se seleccionaron para el análisis confocal. El giro dentado entero de las dos secciones coronales por rata se reconstruyeron usando áreas más grandes de los bloques en el plano 10x Z, en dos secciones por animal; debido al hecho de que en esta área la tinción es más escasa. Aproximadamente se tomaron de 8 a 12 imágenes de cada corte del giro dentado. Para verificar el número de células totales en el giro dentado se tomaron las imágenes sobrepuestas a 40x en todo el giro dentado para un análisis del ARNm del Arc.

Para CA3, tres bloques en el plano Z (1.0 μm óptico de espesor/plano) fueron fotografiadas con unos lentes de inmersión acuáticos a 25x. Para el conteo de las células en estas áreas, del total de planos obtenidos para cada imagen se descartan aquellos en los que resulta imposible discernir los cuerpos celulares debido a la poca resolución de la imagen, los cuales se localizan en los límites superior e inferior del apilado de imágenes. Ya descartado a estos, del

total de planos útiles se dividen entre dos para obtener el plano medio, y a partir de este solo se consideran dos planos por encima y por debajo para el conteo; esto con el objeto de que las células detectables se incluyan en la mayor cantidad de planos posibles y así se logre discernir con mayor fiabilidad si contienen o no la tinción de la marca que se busca detectar.

Para cuantificar la microglía activada, se analizaron las secciones coronales hipocámpicas reconstruidas con un programa de imagen MetaMorph (Universal Image Corporation, West Chester, Pennsylvania). El hipocampo fue dividido en las siguientes áreas de interés: CA3, la capa celular granulosa y la región hilar del giro dentado. Después de captar estas regiones en cada imagen reconstruida, se usó una herramienta de ajuste del umbral de intensidad para detectar toda la tinción de la OX-6, y se midió el área de cada objeto y el número de objetos. Todas las imágenes se analizaron usando las mismas condiciones de umbral. Los objetos detectados oscilaron de 5 a $2000\mu\text{m}^2$. Después de crear una curva de distribución, solo se incluyeron en el análisis aquellos objetos con un tamaño $>65\mu\text{m}^2$ (el tamaño promedio fue de $100\mu\text{m}^2$). Se escogió este tamaño de objeto para igualar más acertadamente el tamaño de las células microgliales activadas y así reducir significativamente los errores de muestreo. Fue entonces corregido el número resultante de objetos usando el área total de cada región de interés y se reportó el número de objetos por región (en milímetros cuadrados).

Los focos nucleares de ARNm del Arc y el ARNm del Arc citoplásmico se observaron dentro del giro dentado. El área de la capa celular granulosa y el número total de neuronas positivas de Arc se evaluaron en cada imagen plana reconstruida con lo que, junto con un estimado del número total de neuronas, se usaron para estimar el porcentaje total de neuronas positivas de Arc. El número total de neuronas/cúmulo se contó y se calculó el área de la capa celular granulosa en μm^2 desde el plano medio. Utilizando este factor se calculó el porcentaje de neuronas con proteína Arc y/o ARNm de Arc en el giro dentado de cada rata acorde a la siguiente fórmula: $100 * p/[A_p * (N/A)]$, Donde p=el número de neuronas Arc positivas en una imagen plana reconstruida dada; N=al número

total de células de todos los 40X apilados-Z; A=área total en μm^2 del giro dentado desde los planos medios de todos los 40X de los bloques en el plano Z.

Las células que resultaron positivas o negativas de proteína Arc se clasificaron de acuerdo con los siguientes criterios. Las neuronas positivas tenían una tinción perinuclear/citoplásmica rodeando al menos 60% de la célula visible en al menos tres planos juntos con el núcleo celular a través del cúmulo Z. Para evitar errores de clasificación, se verificó cuidadosamente que la tinción pertenecía a la célula de interés y no a una dendrita o cuerpo celular de una célula adyacente. Los resultados tanto del ARNm de Arc, como del análisis de la proteína Arc se expresaron como un porcentaje del total de núcleos neuronales analizados por apilado de imágenes. Para cada rata se analizaron las secciones coronales del giro dentado reconstruido, para ARNm del Arc, para proteína Arc, para microglía activada y microglía inactiva.

Análisis de datos.

Se obtiene la proporción de células que expresan el gen por condición experimental y se comparan estos datos entre los diferentes grupos utilizando ANOVA de una vía, utilizando Bonferroni como posthoc. En cuanto a los resultados de la ejecución conductual en el laberinto de agua de Morris se obtienen la latencia y la distancia de llegada al blanco, los cuales se analizan mediante un ANOVA de repetidas medidas, utilizando Bonferroni como posthoc también. Los datos de la prueba se obtienen en la forma de latencia, distancia y número de cruces al blanco y se analizan mediante un ANOVA de una vía.

RESULTADOS

En general, el tratamiento con LPS y con memantina fue bien tolerado por todas las ratas. Sin embargo, al inicio las ratas tratadas con LPS perdieron unos pocos gramos de peso, aunque en pocos días lo recuperaron y continuaron incrementándolo normalmente a lo largo de todo el estudio.

Niveles de Memantina Dentro del Cerebro

El tratamiento con memantina fue bien tolerado y aparentemente no modificó el comportamiento global de los animales. Para determinar los niveles de memantina en el cerebro, los tejidos cerebrales de cada una de las ratas que tenían una minibomba osmótica liberando memantina, así como un subgrupo de animales sin tratamiento de memantina (n=10) fueron analizados por una cromatografía de gas. La medición reveló que a las ratas que se les administró memantina por medio de la minibomba osmótica tuvieron niveles entre 1-6 $\mu\text{g/g}$. Los animales controles presentaron niveles por debajo del límite detectable (p.e, 0.25Mg/g). Dadas ciertas características de la memantina, como su liposolubilidad, la administración crónica usada bajo las condiciones de este estudio mantiene una concentración de suero de $\sim 1\mu\text{M}$ en aproximadamente tres días, una concentración de fluido extracelular de 0.4-0.7 μM , así como una concentración en el tejido cerebral de 12-15 μM ; los niveles libres del fármaco son de 20-50% más bajos debido a el ligando de la proteína (Rogawski y Wenk, 2003), de forma similar a lo que sucede en humanos sometidos a dosis terapéuticas de este medicamento.

El Tratamiento con Memantina Atenúa los Problemas en la Memoria y el Aprendizaje Espacial Causados por el LPS.

La administración de LPS dentro del cuarto ventrículo daña el desempeño de ratas jóvenes en la versión espacial de la tarea de nado de Morris, como se observa por la comparación de estos animales con respecto a los controles tratados con FCEa (ver Figura R1).

El tratamiento con memantina atenúa el déficit, pero no lo corrige completamente. Los animales tratados con LPS y memantina aprenden significativamente más lento que los animales controles, pero finalmente muestran una mejoría en su ejecución comparado a los animales tratados solamente con LPS. El ANOVA de repetidas medidas reveló un efecto entre grupos ($F_{2,41} = 11.54, p < 0.0001$), diferencias entre la latencia promedio de cada día ($F_{3,6} = 17.41, p < 0.0001$) e interacción significativa ($F_{6,123} = 3.097, p < 0.008$). Estos resultados indican un efecto significativo del tratamiento, del entrenamiento y muestran una tendencia significativamente diferente entre los diferentes grupos a lo largo del entrenamiento. El análisis factorial reveló diferencias significativas entre grupos los días 2, 3 y 4 ($p < 0.0001$) en donde los días 2 y 3 el grupo de FCEa fue diferente significativamente con respecto a los otros dos y solo el día 4 los tres grupos son diferentes entre sí (P 's < 0.0001).

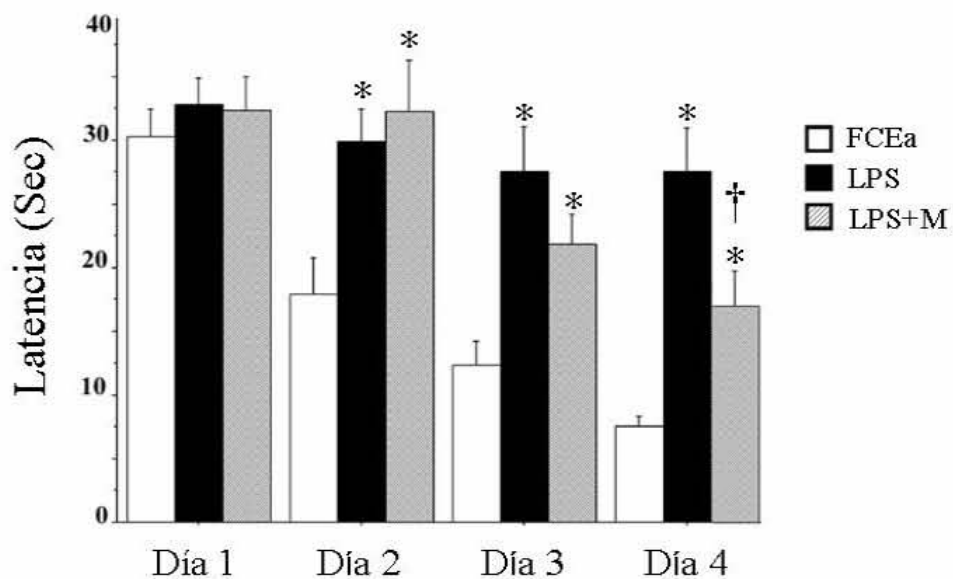


Figura 1R.- Muestra la latencia de llegada a la plataforma en el estanque de agua, medida para cada grupo de ratas a lo largo de cuatro días de tratamiento. Se observa que el grupo control, tratado con FCEa, tiene un significativo mejor desempeño desde el día 2 con respecto a los otros grupos. El grupo tratado con memantina solo manifestó una diferencia significativa con respecto al grupo que solo fue tratado con LPS hasta el día 4, lo cual es representativo de un efecto neuroprotector un tanto lento pero eficaz.

El Tratamiento con Memantina Redujo Significativamente la Activación de la Microglía dentro del Hipocampo.

Para determinar si el tratamiento con memantina es capaz de afectar la activación de las células microgliales durante la administración con LPS, se hizo una inmunotinción fluorescente para el OX-6 y se cuantificó el número de microglías, como se explicó en los métodos.

En los animales tratados con LPS, la tinción inmunofluorescente para el OX-6 confirmó la existencia de numerosas microglías altamente activadas y distribuidas a través de las áreas hipocámpales del giro dentado y de CA3 (Figura R2A). Las microglías activadas mostraron una tupida morfología característica, con un incremento en el tamaño de los cuerpos celulares, los cuales se observaban contraídos y con procesos de ramificación (Figura R2B). Las ratas tratadas LPS y a la vez con memantina tuvieron una escasa actividad microglial esparcida a través de las áreas mencionadas (Figura R2C).

El foco revelado de OX-6 microglial por la inmunopositividad en los animales tratados con LPS y al mismo tiempo con memantina, mostró una morfología activada menos drástica, con cuerpos celulares menos tupidamente contraídos, comparada con la que se dio en los animales administrados con LPS sin tratamiento con memantina, lo cual indica un menor avance en el estado de activación (Figura R2D), como previamente se ha reportado en detalle (Rosi et al., 2003, 2004, 2005).

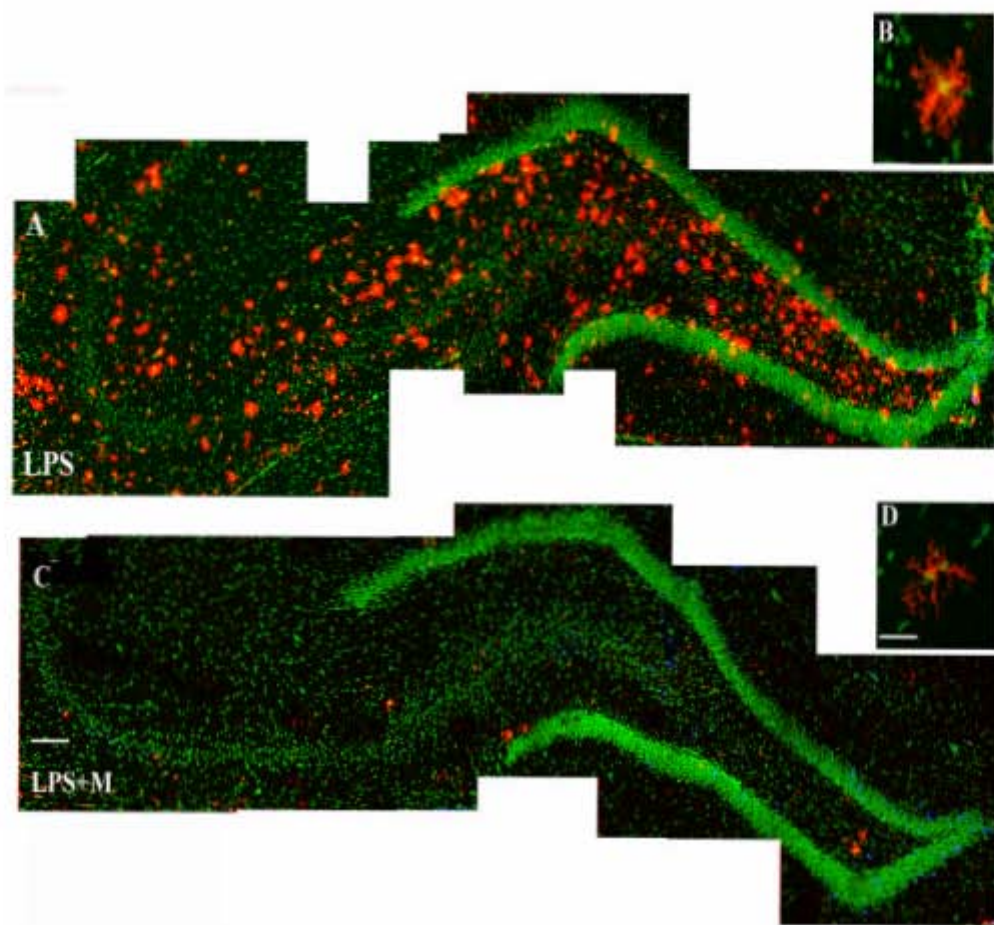


Figura R2.- Reconstrucciones del giro dentado y CA3 del hipocampo utilizando imágenes obtenidas con microscopia confocal. La tinción para la OX-6 se muestra en rojo. En (A) se observa los cerebros de los animales tratados con LPS, hay microglía activada a través de todo el tejido observado con una morfología característicamente tupida, contraída y con ramificaciones (B). En (C) se observa animales tratados con LPS y a la vez con memantina, mostrando que este fármaco es capaz de revertir la activación microglial ya que ésta se muestra escasa y con una morfología distinta (D) a la que se encuentra en la activación microglial intensa.

De esta forma, los animales administrados con LPS que recibieron el tratamiento de memantina, mostraron una reducción significativa en el número de células microgliales activadas dentro de las áreas del giro dentado y de CA3 (ANOVA: $F_{2,30}=7.47$, $p<0.003$ para el área del giro dentado; $F_{2,30}=7.82$, $p<0.001$ para el área de CA3) (Figura R3).

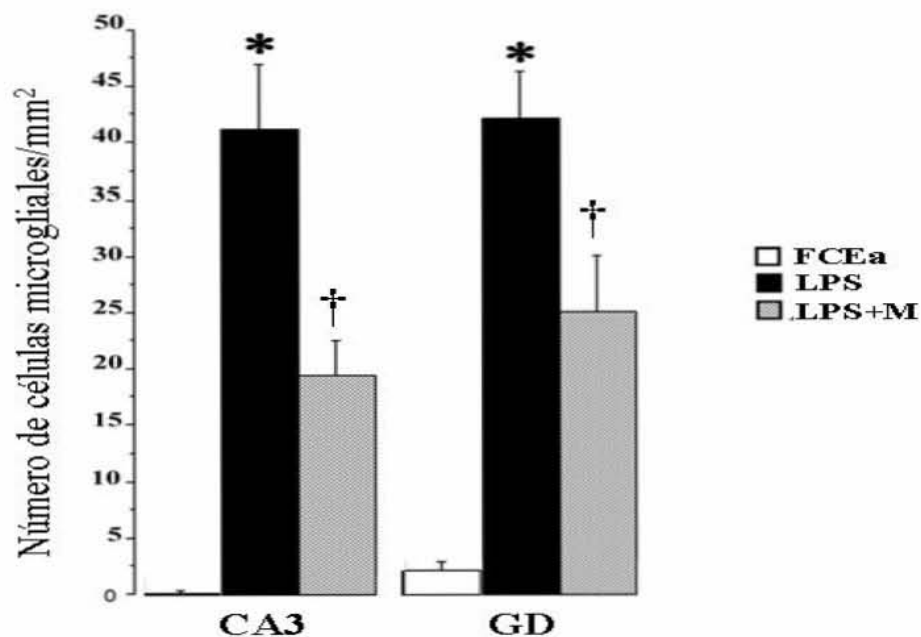


Figure R3.- Los animales tratados con LPS y memantina mostraron una cantidad significativamente menor de microglías activas con respecto a los animales que solo se les dio LPS, esto tanto en el giro dentado como en CA3. Sin embargo, esta cantidad fue significativamente mayor con respecto a los animales controles tratados solo con FCEa, lo que indica que la memantina atenúa la activación microglial pero no la restituye totalmente en su normalidad.

El Tratamiento con Memantina no Afectó a la Microglía Residente

Se ha reportado que el tratamiento con el antagonista selectivo al receptor NMDA, MK-801, es citotóxico para la microglía in vitro (Hirayama y Kuriyama, 2001). Por ello, se decidió visualizar y cuantificar el número total de microglías dentro del hipocampo, para poder entender si el tratamiento con memantina reducía solo el número de microglía activada o afectaba a la población total de microglías. Las células inmunoreactivas al OX-42 estuvieron densamente distribuidas a través de todo el hipocampo de los animales tratados con FCEa, LPS y LPS con memantina (Figura R3A, B, C).

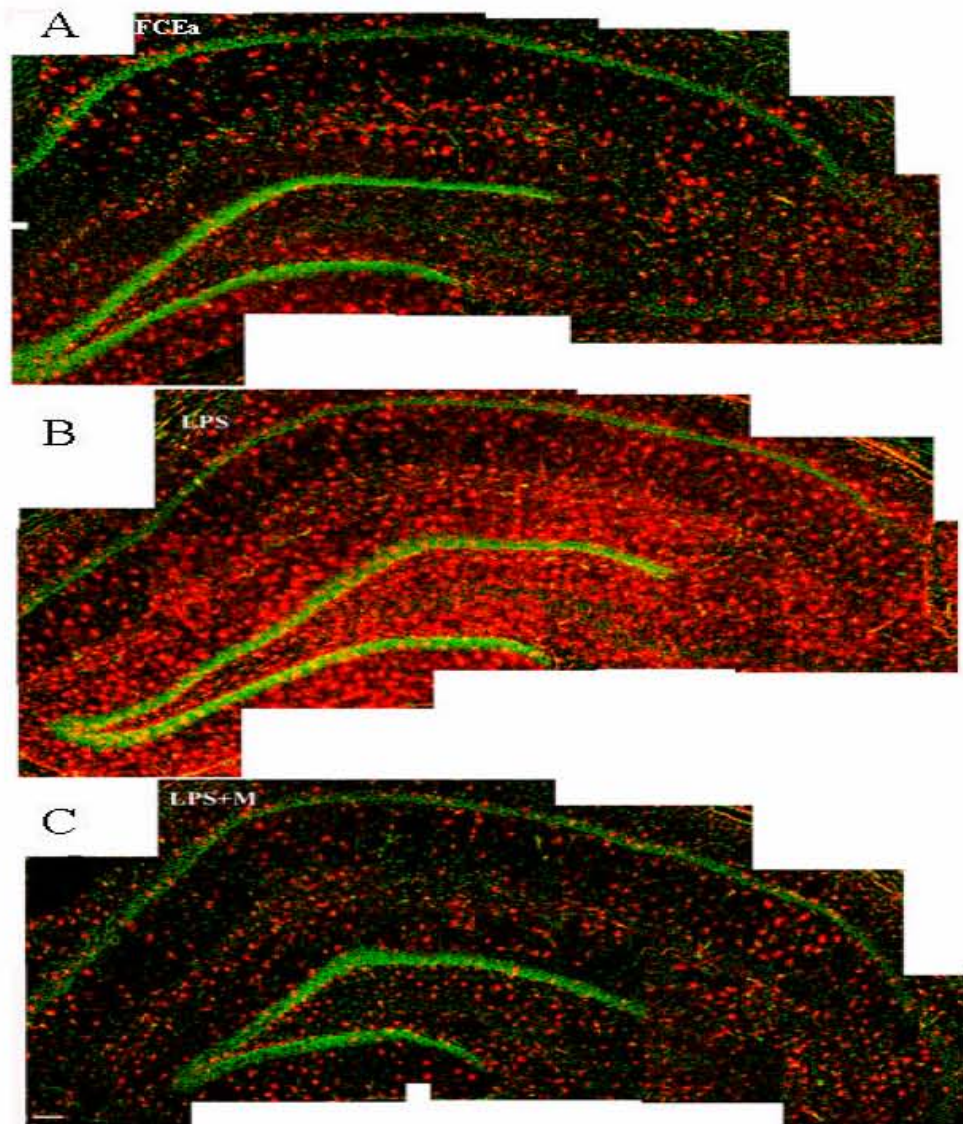


Figura 3.- En los animales tratados con LPS (B) la cantidad de microglías activadas fue claramente mayor que en los otros dos grupos. En estos últimos dos grupos, el de FCEa y el de LPS+M, la cantidad de microglías observadas no pareció mostrar diferencias significativas (Fig. A y C), lo que indica que la memantina desactiva a la microglía a la vez que permite que se mantenga con vida la población basal de estas células.

Mientras que el número de microglías activas fue más alto en animales tratados con LPS (Figura R3B) y la morfología verificó el estado de activación de estas células, entre los animales que solo recibieron FCEa y los que tenían LPS con memantina el total de número no fue significativamente diferente (Figura R3A,C), lo que se constató tanto para el área de CA3 como para el giro dentado (Figura R4) (ANOVA $F_{2,22}=5.7$, $p<0.01$ para el giro dentado; $F_{18,2}=4.4$, $p<0.01$

para CA3). Por tanto, el tratamiento con memantina no altera la microglías en reposo, solo previene su activación y/o migración de regiones cercanas.

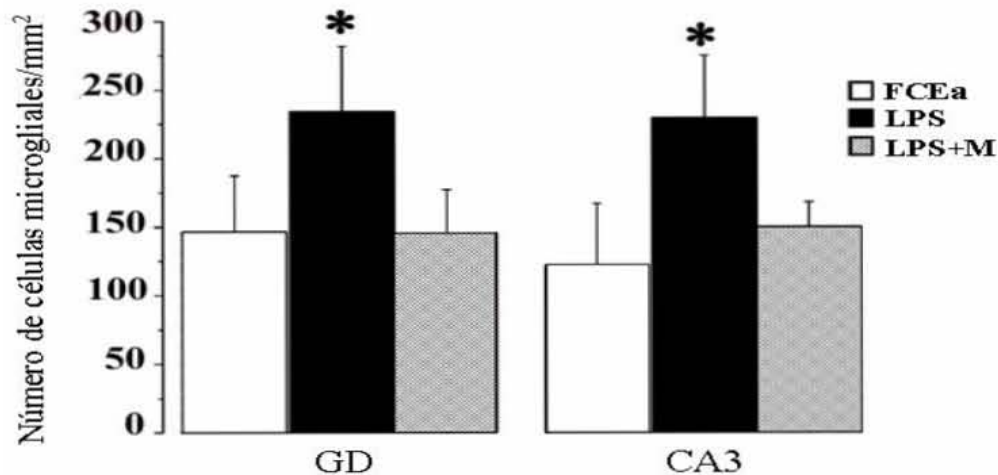


Figura R4.- Gracias al número de microglías detectables por mm² se logró verificar que la memantina no afecta a la microglía residente, lo cual se observa en CA3 y en el giro dentado, ya que no hubo diferencias significativas entre el grupo de FCEa y el grupo de LPS más memantina.

No se Observó Expresión del Receptor NMDA1 junto con Células Gliales.

Una posible explicación para el efecto de la memantina en la neuroinflamación podría ser que las células microgliales activadas expresaran el receptor a NMDA. Aunque hay evidencia en la literatura (Hirayama y Kuriyama, 2001) que podría sugerir la presencia de receptores NMDA en la microglía, en estas células solo se han encontrado receptores metabotrópicos al glutamato (Biber et al., 1999), sin que existan pistas directas de la existencia del receptor NMDA. La memantina es un antagonista no competitivo de los receptores NMDA. De esta manera, se hizo una doble inmunotinción de secciones cerebrales con un marcador específico del receptor NMDA para una de sus subunidades constitutivas, NMDA1 (rojo) y para la microglía la OX-6 (azul), (Figura R5A, B). El análisis de los tejidos de alta resolución por microscopía confocal, reveló que la microglía activada nunca se localizó junto con un receptor NMDA1. Estas observaciones indican que la memantina no actúa directamente a través del mecanismo del receptor NMDA. No obstante, no pudimos excluir la

posibilidad de que la memantina actué directamente en el receptor nicotínico alfa-7 o en un sitio del receptor no conocido expresado por la glía activada.

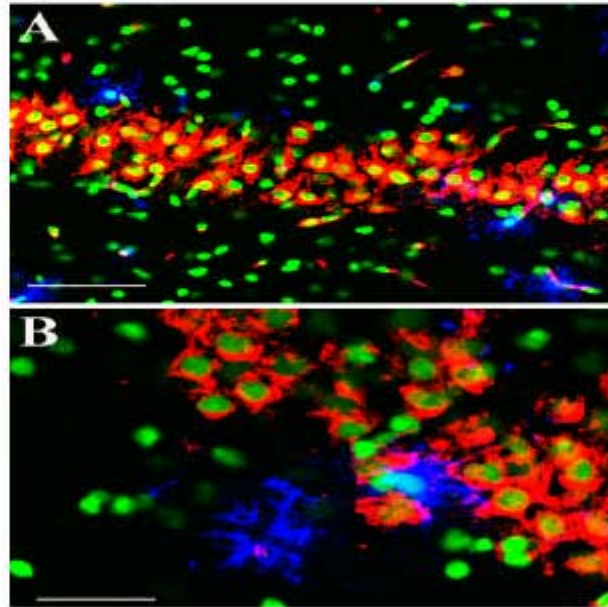


Figura R5.- Imágenes reconstruidas por microscopía confocal. En rojo se observa una subunidad cosntitutiva del receptor MNDA, la NMDA1 y en azul la OX-6 que sirve para detectar a la microglía activa. No se observó la presencia de las dos tinciones juntas, lo que indica que la microglía no parece tener receptores NMDA sugiriendo que la memantina no debe de realizar sus efectos sobre estas células.

El Tratamiento con Memantina Normalizó la Expresión de Arc en el Giro Dentado.

El porcentaje de las células expresando ARNm y proteína del Arc en las células granulares del giro dentado de los animales tratados con FCEa, fue comparable al reportado previamente (Rosi et al., 2005; Ramirez-Amaya et al., 2005; Chawla et al., 2005): el ARNm del Arc inducido por la primera sesión de exploración se evidenció como ARNm citoplasmático rodeando el 1.5% (SE=0.2) de los núcleos celulares de las células granulares del asta superior del giro dentado (Figura R6), lo cual es consistente con los registros electrofisiológicos mostrando una escasa actividad del giro dentado durante la exploración (Jung y McNaughton, 1993).

Los animales tratados con LPS mostraron un incremento significativo en el porcentaje de neuronas positivas a la proteína y ARNm del Arc inducido

conductuálmente en el asta superior del giro dentado (figura B, E), arriba de aquellas ratas de exploración tratadas solo con FCEa (Figura R6A, D), lo que resulta consistente con los descubrimientos recientes (Rosi et al., 2005). En los animales a los que se les administró LPS a la vez que memantina, el porcentaje de las células granulares expresando proteína y ARNm del Arc inducido conductuálmente en el asta superior del giro dentado, fue significativamente más bajo que en los animales a los que solo se les administró LPS (Figura R6C, F) ($p < 0.001$). La memantina condujo a que los niveles de Arc retornaran a condiciones similares a las dadas en los animales tratados con FCEa que exploraron el mismo ambiente (Figura R6A, C, D, F).

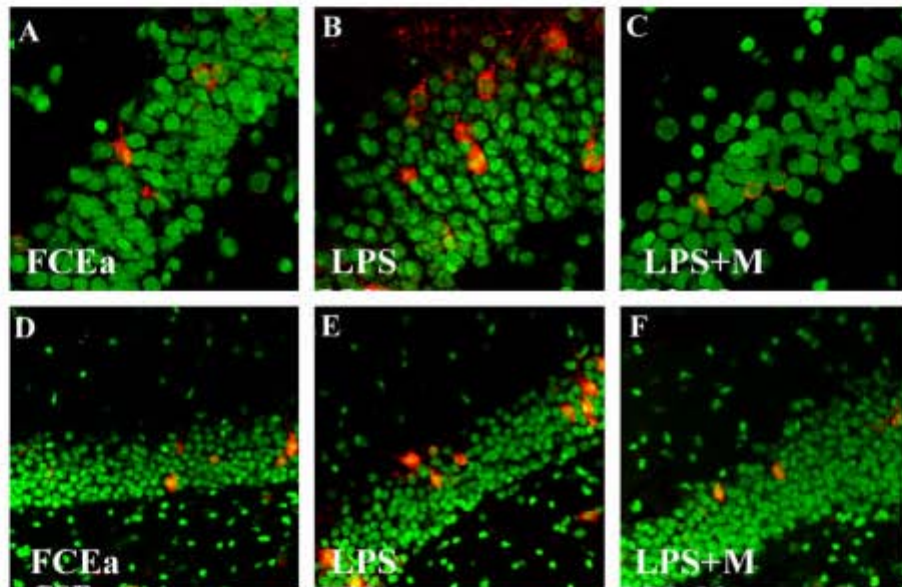


Figura R6.- Reconstrucción del asta superior del giro dentado con imágenes de microscopía confocal. Todos los grupos fueron introducidos al ambiente de exploración y por eso se observa respuesta del Arc en todas las imágenes. El grupo tratado con LPS (B,E) tiene una expresión de Arc mayor que los otros dos grupos, lo que corrobora que el LPS exagera la expresión de este gen, inducida por la exploración, y que la memantina atempera dicho efecto, lo que se muestra por la similitud entre los grupos con FCEa y los de LPS más memantina (A,C,D,E).

En el asta inferior del giro dentado a los animales del grupo de exploración a los que se les dio solo FCEa, el porcentaje de neuronas expresando proteína y ARNm del Arc no aumentó con respecto a los animales controles enjaulados; mientras que en los grupos de exploración tratados con LPS mostraron un incremento significativo en el porcentaje de neuronas con

proteína y ARNm del Arc (Figura R7), como se ha reportado previamente (Rosi et al., 2005). Notablemente los animales tratados con LPS y a la vez con memantina, mostraron un porcentaje de células granulares expresando Arc de forma similar a los animales controles enjaulados y a los administrados con FCEa (ANOVA: $F_{3-41} = 11.6$, para el RNAm del Arc en el asta inferior del giro dentado; $F_{3-31} = 11.29$ para la proteína Arc; $p < 0.0001$ en todos los casos)

La exploración de un ambiente novedoso produjo un incremento significativo del porcentaje de neuronas expresando proteína y ARNm del Arc en el asta superior del giro dentado, por encima de los animales controles enjaulados en todos los tres grupos examinados (Figura R7) (ANOVA: $F_{3,41} = 21.23$ para el ARNm del Arc citoplasmático en el asta superior del giro dentado; $F_{3,31} = 20.29$ para la proteína Arc del asta superior del giro dentado; $p < 0.0001$ en todos los casos)

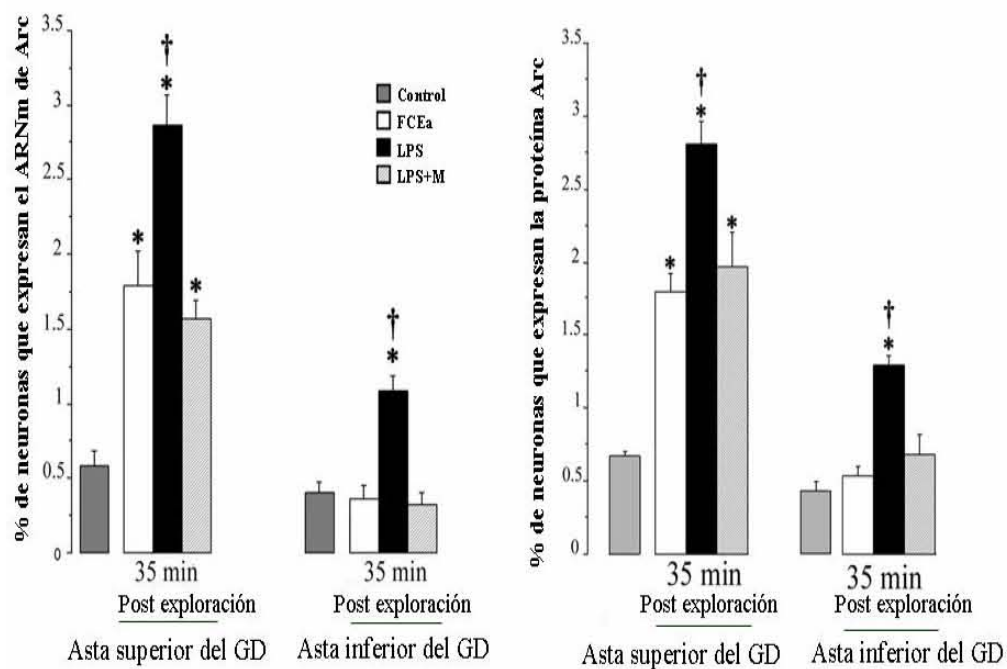


Figura R7.- Se observa como el LPS incrementó significativamente el porcentaje de neuronas expresando tanto ARNm como proteína Arc en el asta superior e inferior del giro dentado. La memantina revirtió este efecto retornando el porcentaje de neuronas expresando Arc a los niveles del grupo tratado solo con FCEa. En el asta inferior destaca el hecho de que la exploración no pareció inducir un incremento en el porcentaje de células expresando proteína y ARNm del Arc, ya que no hubo diferencias significativas, de los grupos de FCEa y LPS+mem, con respecto al grupo enjaulado, lo que pone de manifiesto diferencias en cuanto a la respuesta del asta superior e inferior del giro dentado ante la exploración espacial.

El tratamiento con memantina revirtió el efecto del LPS tanto sobre el asta superior como sobre la inferior. Estos resultados sugieren que el tratamiento con memantina puede prevenir la alteración de los patrones anatómicos de la expresión de Arc, inducida por la exploración en el asta superior e inferior del giro dentado durante la administración de LPS.

El Tratamiento con Memantina Normalizó el Porcentaje de Neuronas Expresando Arc en las Neuronas Piramidales de CA3.

El tratamiento con memantina fue capaz para retornar el porcentaje de neuronas expresando proteína y ARNm del Arc a niveles similares a los animales a los que se les administró FCEa, llevando estos niveles a un porcentaje significativamente más bajo que los animales con LPS que exploraron el mismo nuevo ambiente (Figura R8).

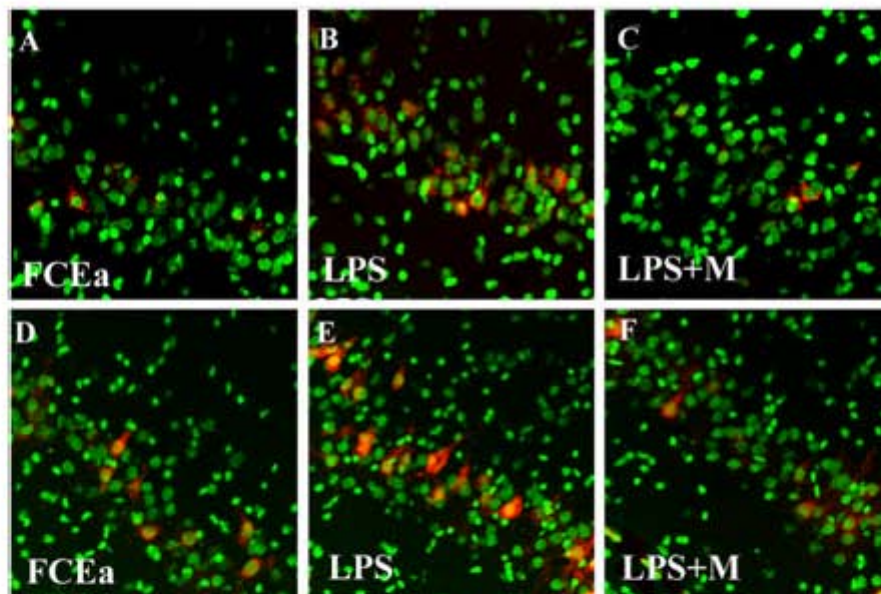


Figura R8.- Reconstrucción de CA3 con imágenes de microscopía confocal. Todos los animales se introdujeron al mismo ambiente de exploración. El grupo tratado con LPS (B,E) muestra un mayor porcentaje de neuronas expresando Arc, a diferencia del grupo tratado solo con FCEa (A,D) y el administrado con LPS más memantina (C,F) en los cuales el porcentaje de neuronas expresando Arc fue muy similar. La memantina es por tanto eficaz para revertir la expresión de Arc causada por el LPS.

La proporción de neuronas piramidales expresando Arc después de la exploración de un ambiente novedoso en el área de CA3, fue similar al que previamente se ha reportado (aprox. 20%), (Vazdarjanova y Guzowsky, 2004;

Ramírez -Amaya et al., 2005; Rosi et al., 2005). Siguiendo a la exploración de un nuevo ambiente, el porcentaje de neuronas piramidales expresando proteína y ARNm del Arc en animales tratados con LPS fue significativamente más alto que en los animales controles con FCEa que exploraron el mismo ambiente. (ANOVA; $F_{3,42}=25.3$, $p<0.0001$ para el ARNm del Arc, $F_{3,42}=20.18$, $p<0.0001$ para la proteína Arc), (Figura R9). Estos resultados demuestran que el tratamiento con memantina puede prevenir los efectos del LPS sobre la expresión del gen Arc inducido conductualmente en el área de CA3.

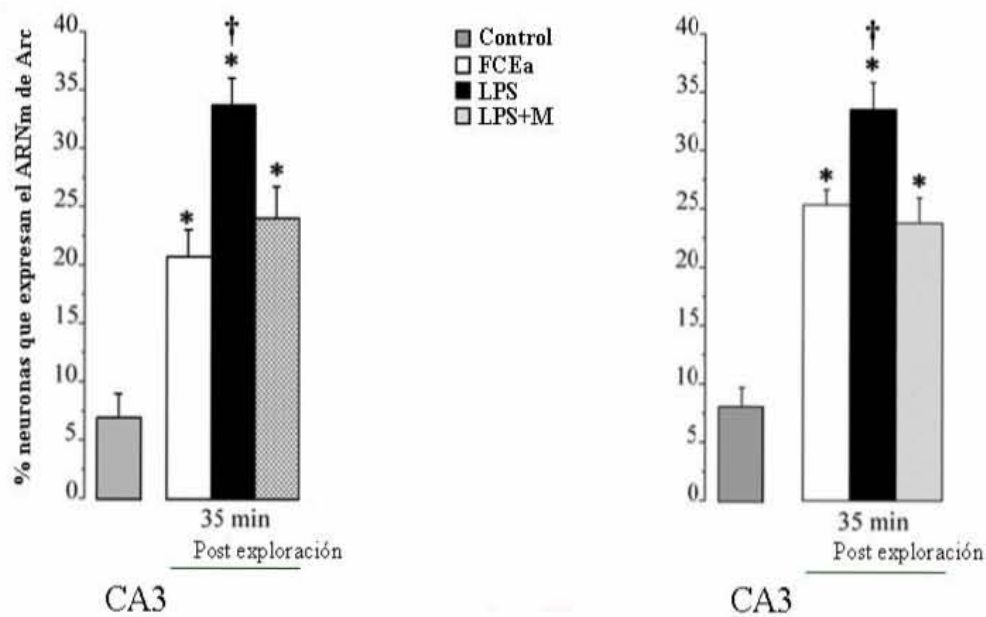


Figura R9.- Se muestra como en CA3 el LPS incrementó significativamente el porcentaje de neuronas expresando ARNm y proteína del Arc. La memantina fue capaz de reestablecer tal incremento al nivel de los animales tratados solo con FCEa. El mayor porcentaje de neuronas expresando Arc de los grupos FCEa y LPS más memantina con respecto al grupo control enjaulado, se debe a la estimulación que la conducta de exploración provoca sobre la expresión del gen.

En síntesis podemos decir que el tratamiento con memantina normalizó la expresión del Arc alterada por la inflamación, además de que redujo significativamente el número de la microglía activada dentro de las áreas del hipocampo en el giro dentado y en CA3; esto es, que la activación selectiva de la microglía provocada por la presencia de LPS dentro del hipocampo puede ser reducida significativamente si se administra memantina. Esta previene la sobre expresión de Arc y atenúa los problemas de memoria producidos por el LPS crónico.

DISCUSIONES

La Memantina Normalizó la Expresión Alterada del Arc durante la Neuroinflamación Crónica.

Consistente con otros recientes descubrimientos (Rosi et al., 2005), los resultados de este estudio han verificado que el tratamiento crónico con LPS dentro del cuarto ventrículo, causa un incremento selectivo y significativo en el porcentaje de neuronas expresando Arc dentro de las áreas de CA3 y del giro dentado, lo cual además correlaciona con la presencia de microglía activada dentro de estas mismas regiones. La expresión del Arc, como se sabe, es dependiente del receptor NMDA (Steward y Worley, 2001), por tanto, estos receptores, así como las neuronas receptivas a ellos, corren un grave peligro durante la neuroinflamación, cuando los astrocitos y la microglía activa liberan glutamato y citocinas proinflamatorias. Los niveles elevados de glutamato provocan una sobre-estimulación de la entrada de calcio a través del receptor NMDA, con una transitoria regulación a la baja de la expresión del gen de este receptor (Goebel y Poosch, 2001) y una consecuente pérdida de neuronas receptivas al NMDA debido a la excitotoxicidad (Rosi et al., 2004). Así, pues, los niveles elevados de glutamato extracelular son, en gran medida, responsables para el drástico incremento de las neuronas expresando Arc en estas zonas cerebrales. A su vez, la entrada excesiva de calcio es uno de los factores que retroalimentan la expresión alta del gen en una anormal proporción de neuronas.

El hecho de que la memantina retorne a niveles normales tanto el ARNm como la proteína del Arc, muestra que este fármaco repercute sobre la transcripción de Arc. Uno de los mecanismos que subyacen a este efecto, es un resultado de la disminución en los niveles de calcio que estimulan a la postsinápsis por la presencia de los factores neuroinflamatorios, tales como el LPS. Consistente con esta hipótesis, es el descubrimiento de que la expresión de Arc es dependiente del receptor NMDA (Steward y Worley, 2001), que su mediación requiere calcio mediado por la activación de AMPc (Waltereit et al., 2001) y que se conoce que actúa solo en el canal abierto del NMDA inhibiendo

hacia las actuales despolarizaciones (Danysz et al., 1997). Esto sugiere que el calcio juega un papel crítico en los daños cognoscitivos dados por la neuroinflamación crónica. A causa de que la memantina provee un bloqueo parcial del receptor NMDA y restringe la entrada de calcio, enfrenta y contrarresta los niveles altos de sinápsis glutamatérgicas, este tratamiento puede prevenir el decline en el aprendizaje y la memoria atenuando la neuroinflamación, lo cual puede ser particularmente importante en la prevención de la disfunción neuronal.

Actualmente, la memantina se usa para la enfermedad de Alzheimer, y a diferencia de otros antagonistas del receptor NMDA, actúa solo en el canal abierto sin afectar los receptores inalterados. Estudios electrofisiológicos han mostrado que la memantina puede inhibir las corrientes del receptor NMDA con un valor de IC_{50} en el rango cercano de $2\mu M$ (Danysz et al., 1997). Por eso este fármaco, a través del receptor NMDA y restaurando el señalamiento normal de calcio, puede llevar a un nivel normal la expresión de Arc dentro de CA3 y del giro dentado. Así, los resultados de este estudio sugieren que las neuronas del hipocampo expuestas al LPS, son más susceptibles para la excitación glutamatérgica a través del componente del receptor NMDA, mientras que el tratamiento con memantina es capaz de restaurar la expresión fisiológica del Arc, protegiendo del avance de la inflamación y del incremento en la proporción de neuronas activadas por la exploración espacial.

El Tratamiento con Memantina Reduce el Número de Microglía Activada.

Durante la neuroinflamación varios estímulos pueden afectar selectivamente la función glial o neuronal, lo que al final puede tener como consecuencia un alteración en el dialogo entre estas células que trastoca la función normal de los procesos cognoscitivos. A causa de que la microglía responde rápidamente para el daño neuronal y tiene fuertes efectos sobre neuronas y astrocitos, las células microgliales sin duda alguna inciden en el despliegue de la cascada multicelular que se produce en los mecanismos de plasticidad sináptica afectados por un daño en el tejido. El daño neuronal

inducido por distintos estímulos, usualmente resulta en cambios funcionales y morfológicos en las células gliales circundantes, constituyendo esto lo que se conoce como activación glial. Se ha propuesto que la activación de las células gliales y los consecuentes procesos neuroinflamatorios, contribuyen a la etapa inicial de la enfermedad neurodegenerativa (Benveniste et al., 2001). Previamente se ha demostrado que el efecto de la neuroinflamación es selectivo a la región, de igual manera en que la presencia de microglía activada correlaciona, en forma específica a la región, con la alteración en la expresión de la actividad sináptica relacionada con el gen Arc (Rosi et al., 2005).

Los presentes resultados muestran que el tratamiento con memantina es capaz de reducir el número de microglía activada en vivo durante la neuroinflamación crónica. Lo cual es consecuente con el descubrimiento reciente de que el tratamiento con memantina aumenta la recuperación funcional y promueve efectos anti-inflamatorios en un modelo en rata de hemorragia intracerebral (Lee et al., 2005). A su vez, se ha descubierto que los animales tratados con memantina tienen significativas reducciones en la cantidad de la degeneración neuronal, cuando esta ha sido inducida por beta-amiloide (Miguel-Hidalgo et al., 2003). Con base en esto, la cuestión sería saber si la memantina puede actuar directamente sobre las células microgliales o indirectamente a través de todas las neuronas.

Efectos de la Memantina sobre la Activación Microglial

Aunque se conoce que el contacto directo entre las células gliales y las neuronas, así como los factores solubles liberados por estas últimas cuando están peligro, juega un papel importante en el fenómeno inflamatorio, mucho de la naturaleza de la señal que induce la activación glial en respuesta al daño neuronal permanece desconocida.

Se ha observado que la alteración en las neuronas, a causa del alto nivel de glutamato, hace que estas liberen quimioquinas que a su vez activan a las microglías tanto cercanas como remotas (de Jong et al., 2005). En este sentido se ha visto, en estudios in vitro (Viviani et al., 2005), que la exposición de las

neuronas al IL-1 β , una citocina proinflamatoria producida tanto por neuronas como por glías en varias condiciones patológicas, puede aumentar significativamente la función de los receptores NMDA. Así mismo, el factor alfa de necrosis tumoral (FNT- α) es otra citocina proinflamatoria importante liberada por microglías y neuronas, la cual es un eslabón entre la sobreactividad neuronal y la modulación de la microglía. La expresión de FNT- α es inducida rápidamente en neuronas siguiendo la activación de los receptores NMDA, lo cual es una señal para la activación y proliferación de la microglía circundante (Akiyama et al., 2000). Esta citocina puede impedir la recaptación del glutamato por los astrocitos, resultando en un incremento del glutamato extracelular. La microglía reactiva puede continuar expresando FNT- α como parte de la amplificación y el mantenimiento de la cascada inflamatoria. Los datos in vitro sugieren que el FNT- α puede causar la liberación de otras citocinas, tales como la IL-1 β de astrocitos reactivos, que puede incrementar la entrada de iones de calcio en la postsinapsis, sugiriendo mecanismos de activación de la microglía y de las neuronas tanto autócrinos como parácrinos, (Akiyama et al., 2000).

Por otro lado, se ha sugerido la hipótesis de que los cerebros con la enfermedad de Alzheimer proveen el apropiado ambiente inflamatorio, mediado microgliálmente, para que el glutamato y el TNF- α estimulen sinérgicamente la activación tóxica de sus respectivas redes de comunicación con las neuronas, contribuyendo con ello al mecanismo de muerte celular (Floden et al., 2005). Por lo tanto, el nivel elevado de estas citocinas proinflamatorias presentes durante la neuroinflamación crónica (Griffin et al., 1998), exacerba la activación de los receptores NMDA con el consecuente incremento de Ca⁺⁺, la alteración del gen tempranamente inmediato Arc y la liberación de factores que mantienen e incrementan el ciclo vicioso.

La memantina puede interrumpir este círculo a nivel neuronal y/o a nivel glial o en ambos. Debido a esta habilidad para aminorar la sobre-estimulación de los receptores NMDA, la memantina restaura la función sináptica normal y consecuentemente previene la liberación de moléculas proinflamatorias de las neuronas alteradas así como la consecuente activación de la microglía cercana.

Durante la infusión de LPS los niveles altos de glutamato activan la fosfolipasa A2 (PLA2) con la consecuente liberación de ácido araquidónico (AA) por las neuronas. Esto resulta en la formación de prostaglandinas que actúan sobre la microglía para incrementar el ciclo de la inflamación (Lee et al., 2004). Al restaurar la entrada normal de calcio, la memantina puede prevenir la liberación de AA y la consecuente liberación de prostaglandinas lo cual conlleva a una baja activación de células gliales.

El hecho de que la memantina normalice la expresión del gen y disminuya la actividad microglial sin afectar el número total de microglía, sugiere que el calcio es crítico para el mantenimiento de la completa respuesta inflamatoria. En conjunto, los resultados pueden explicar en principio que en la presencia de LPS, la memantina, al bloquear aleatoriamente los canales abiertos del NMDA, retorna a la normalidad los mecanismos de expresión del gen y detiene el ciclo autopropagatorio de la neuroinflamación. Lo cual es congruente con la evidencia de que, de igual forma, aumenta la recuperación funcional y los efectos anti-inflamatorios en un modelo de hemorragia intracerebral (Lee et al., 2004).

Con respecto al mecanismo molecular específico que media el efecto de la memantina sobre la microglía activada, la cuestión radica en saber si puede actuar directamente sobre las células microgliales o indirectamente afuera a través de las neuronas, o en ambas. Parece ser que la evidencia apunta a la idea del efecto indirecto sobre la sinápsis por medio de las neuronas. Ya que ni los astrocitos ni la microglía activa parecen expresar receptores NMDA, el cual es el sitio de acción de la memantina, implicando que la reducción de la activación de la microglía es un mecanismo indirecto que actúa a través de las neuronas. En apoyo de esta hipótesis, no se encontró evidencia de la expresión de los receptores NMDA en células microgliales activadas durante la neuroinflamación crónica. Así mismo, la actividad sináptica repercute necesariamente sobre la activación de la microglías, ya que estas células poseen un canal de potasio que hace que sean muy sensibles a los cambios en el potasio extracelular (Katterman et al., 1990), haciéndolas muy susceptibles a la despolarización neuronal (y a la consecuente liberación de potasio

circundante). Por tanto, el estado activado se halla determinado directamente por la despolarización neuronal que ocurre, en mayor medida, durante la neuroinflamación. La memantina, que actúa directamente para contrarrestar el incremento en la despolarización neuronal, decreta en consecuencia la activación microglial.

No obstante, hay evidencia en la literatura de la expresión de subunidades del receptor al glutamato en células gliales del área CA1 del hipocampo, siguiendo a la isquemia transitoria del cerebro posterior (Gottlieb y Matute, 1997); por lo que no se puede excluir la posibilidad de que en este periodo (28 días), las células microgliales ya no expresen algún receptor NMDA y el efecto que se observó esté relacionado a una acción temprana sobre ellas en la que presuntamente podrían haber tenido tales receptores. Por consiguiente, la acción directa de la memantina sobre la microglía necesita ser tomada en cuenta, a pesar de la carencia patente de los receptores NMDA en estas células. Con mayor razón si se toma en cuenta que la memantina muestra afinidad para los receptores nicotínicos alfa-7, los cuales son expresados también por la célula microglial. Esto abre la posibilidad para considerar una acción directa de la memantina sobre estas células, la cual estaría basada sobre estos receptores nicotínicos recientemente descubiertos en un cultivo de microglía (Shytle et al., 2004); pese a que dicho fármaco muestra una baja afinidad por ellos.

En General el Tratamiento con Memantina Rehabilita el Diálogo Microglía-Neurona

Debido que la neuroinflamación es un proceso complejo que implica una retroalimentación constante entre las neuronas y las glías, del cual depende el umbral que desencadena la respuesta inflamatoria o, en contraste, se promueven sustancias que la contrarrestan, el problema se sitúa de la siguiente manera: está la respuesta inflamatoria desatada en principio por las neuronas que detectan un estado aversivo en su medio, o por el contrario las células gliales son las que detectan tal estado y después se comunican con las

neuronas; ¿cómo interactúan las relaciones entre los dos tipos de células para promover o detener la inflamación del tejido?

Ya que la microglía reacciona rápidamente al daño neuronal provocando un marcado efecto sobre las neuronas y los astrocitos, es claro que desempeña una cierta eficacia sobre la organización de la cascada multicelular que siguen a la plasticidad y al daño sináptico. La activación crónica de la microglía causa una significativa y prolongada producción de citocinas microgliales, lo cual lleva al daño de las células neuronales y a mayor activación de la microglía. Así, los varios estímulos que durante la neuroinflamación pueden selectivamente afectar la función neuronal y glial, traen como consecuencia final una disfuncionalidad en la interacción entre estos dos tipos de células que conduce a un ciclo tóxico de retroalimentación positiva en el cual la microglía activada libera mediadores inflamatorios, tales como citocinas (IL-1 β y TNF- α) y ácido araquidónico. Estos factores claramente pueden exacerbar el daño neuronal (Griffin et al., 1998; Akiyama et al., 2000; Mrak y Griffin, 2005). Todo esto apunta a la existencia de ciclos de neurodegeneratividad que son dependientes de las interacciones microglía-neurona tal como los sugeridos para la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas.

Lo cual destaca que la habilidad de la microglía para prevenir o empeorar el daño neuronal es altamente dependiente de un equilibrio entre las interacciones de las microglías y las neuronas (Polazzi y Contestabile, 2002). Estas últimas células, cuando se encuentran saludables, tienen una fuerte incidencia sobre la amplitud y la duración de la activación de la microglía, así como en la modulación del daño relacionado con la edad en las funciones cognitivas (Mrak y Griffin, 2005). Por tanto, restaurar neuronas saludables puede prevenir la activación de la microglía y detener el ciclo vicioso que lleva a la muerte neuronal final. Estas observaciones resultaron en el concepto de que la memantina, al restaurar la dinámica normal de calcio y el funcionamiento neuronal relacionado con esta, previene la liberación de factores de señalización que la microglía activa. Mientras el uso de fármacos antiinflamatorios puede traer consigo, como efecto colateral, el desactivar toda la microglía, una acción

indirecta del fármaco que restaure la normalidad en una fase temprana de la inflamación, puede tener menores consecuencias colaterales dejando a las microglías todavía con capacidad para responder a cualquier otro daño.

La Memantina Restituye el Desempeño Conductual, Afectado por la Neuroinflamación, en Tareas de Aprendizaje Espacial.

Es importante resaltar que la memantina no afecta la actividad locomotora espontánea ni otras conductas tales como el nado en el laberinto de agua de Morris. Los datos de este estudio demuestran que, en dosis neuroprotectoras, no tiene efecto sobre el aprendizaje y la memoria, por el contrario, su administración mejora el desempeño en la adquisición, alterada por la administración de LPS, de la tarea espacial en el laberinto mencionado, restituyendo el comportamiento sino al nivel de los animales que no padecen neuroinflamación si en nivel más óptimo que los que sí la padecen. Sin embargo, estos efectos son dependientes de la dosis administrada. Recientes reportes (Creeley et al., 2006) que usaron ratas hembras adultos, sugieren que una administración aguda de memantina (20 mg/kg) por inyección intraperitoneal produce efectos no esperados sobre algunas conductas y por consiguiente sobre los mecanismos moleculares mencionados en este estudio; con tales dosis altas se han reportado ataxias, miorelajación y estereotipias (Wenk et al., 1996). En humanos, las dosis terapéuticas (típicamente de 20-30 mg/día) por un periodo estable (tratamiento crónico de varias semanas), muestran niveles de memantina en sangre en un rango de 0.4-0.9 μM . En este estudio se logró obtener un nivel de fármaco en sangre igual que el dado en humanos con dosis terapéuticas, gracias al mecanismo de las minibombas osmóticas; esto gracias a que la memantina se acumula en compartimientos intracelulares (principalmente por lisosomas).

Mientras que algunos antagonistas al receptor NMDA, en dosis altas bloquean la plasticidad sináptica, así como el aprendizaje en la tarea de nado de Morris, la memantina, a dosis bajas, tiene de una baja a moderada afinidad por el canal del receptor NMDA, y exhibe características bloqueantes de canal

dependientes de un fuerte voltaje, así como una rápida cinética por la que no bloquea el canal por un tiempo prolongado (Parsons et al., 1995). A causa de estas propiedades farmacológicas y biofísicas únicas, la memantina dada en dosis bajas puede bloquear selectivamente el influjo patológico de calcio a través de los receptores NMDA sin afectar la transmisión dependiente de voltaje del receptor NMDA, lo cual es crítico para el aprendizaje y la memoria (Zajackowski et al., 1996) y la durabilidad de la plasticidad sináptica (Barnes et al., 1996).

Aproximaciones Generales

Llegado a este punto, es de primordial importancia el tratar de aclarar los límites a los que se ciñen los siguientes planteamientos, en tanto son producto de un trabajo para acreditarme como licenciado, no pueden, ni mucho menos, resolver las distintas preguntas que se plantean con esta investigación. Ya que estas, como se hizo ver, se plantean en múltiples niveles de análisis, y puesto que mi formación como psicofisiólogo me obliga a intervenir en la articulación de algunos de esos espacios teóricos –en especial entre la fisiología y la teoría psicológica del aprendizaje–, pretendo menos resolver incógnitas que plantear justas consideraciones que puedan servir de hilo conductor para futuras investigaciones.

Las discusiones precedentes dejan claro que la memantina, en concentraciones terapéuticamente relevantes, protege contra la disfunción neuronal inducida por la neuroinflamación crónica, permitiendo que la expresión de Arc recupere sus características normales. La cuestión que se pretende abordar en este apartado, es la que se refiere a la relación que tienen los mecanismos fisiológicos implicados en la neuroinflamación con respecto a la teoría del aprendizaje y la memoria que se esbozó en el primer capítulo.

Es claro que el patrón alterado de la expresión de Arc dentro del hipocampo repercute, dado el papel conocido que este gen tiene en la participación para la formación del citoesqueleto, en los daños cognoscitivos observados en enfermedades neurodegenerativas asociadas con la

neuroinflamación. La sobreexcitación glutamatérgica causada por la respuesta inflamatoria determina la sobre-expresión de Arc, a la par de que hace a esta más difusa, ya que paradójicamente existe una menor cantidad de receptores NMDA.

Parece ser que este fenómeno impide la formación normal de la memoria, lo cual puede estar causado por la interrupción inmediata en el patrón de disparo del ensamble neuronal, o porque no permita a la reverberación coordinada inicial del ciclo de fase consolidarse los cambios estructurales propios de la memoria a largo plazo. Como la transcripción de este gen en ondas de expresión determinadas por periodos específicos de tiempo se ve desregulada, se afecta la repetición coordinada a largo plazo de los circuitos neuronales con lo cual la capacidad de representación de la información se ve reducida; o, un tercer caso, es que estén afectadas ambas cosas a la vez, la coordinación de disparo inmediata del ensamble y la mediada por distintos periodos.

En este sentido, dado que el gen Arc se traslada de manera específica a las regiones dendríticas donde existe mayor activación, participa por ello en los procesos de reclutamiento y exclusión de las conexiones sinápticas de los ensambles neuronales, la neuroinflamación, al trastornar el orden específico de encendido provoca un sobrelapamiento de disparo caótico; esto podría explicar, no solo las deficiencias para memorizar nueva información, sino el estado casi permanente de confusión típico de la demencias seniles tales como el Alzheimer.

Ahora bien, en los enfermos con demencias seniles, tipo Alzheimer, la incidencia de la patología en la memoria atañe sobre todo a la dificultad de almacenar nueva información (Germano y Kinsella, 2005) para la formación de nuevos recuerdos, quedando los más viejos, así como los relacionados con las conductas básicas de supervivencia, mas renuentes a desaparecer; estos, por decirlo así, resisten más y solo son gravemente afectados en los grados más avanzados de la enfermedad. Esto indica que los sistemas neuronales más

primitivos, incluyendo los innatos, son menos susceptibles a las patologías relacionadas con la neuroinflamación.

Lo cual no es de extrañar si se considera la teoría de que el aprendizaje no es realmente algo ajeno lo innato, sino la recombinación de este, la complejización de los circuitos que lo constituyen. El aprendizaje fortalece los circuitos de fase neuronales primitivos por medio de engrosar y hacer más robustas sus sinápsis, formar nuevas conexiones que se articulan sobre estas, así como la incorporación de nuevos ensambles que harían redundante el procesamiento por la codificación en paralelo de la información. Así, cuando el sistema sufre daño, las pérdidas neuronales y conectivas van disminuyendo la complejidad de los ensambles hasta que se reducen como a su periodo inicial básico, por la desaparición de todos los ensambles que redundan sobre las mismas memorias. Esto puede servir para explicar porque no es claramente discernible, a no ser por la velocidad del daño, la degeneración producto del envejecimiento y la provocada por una enfermedad demencial. El proceso general, como lo indican los descubrimientos, parece ser el mismo y la enfermedad se manifiesta solo cuando se alcanza un cierto grado de degeneración, o lo que es lo mismo, si así puede decirse, cuando la descomplejización de los circuitos de fase neuronales ha alcanzado un grado suficiente para que el sujeto manifieste problemas en su vida social y laboral; también es congruente con las nociones que hablan de una cierta reserva cognoscitiva, según el ejercicio intelectual que halla tenido el paciente a lo largo de su vida, tendrá mayor o menor resistencia a la degeneración neuronal.

La memantina, al incidir sobre la inflamación del tejido permite la expresión coordinada del Arc, es decir, que la respuesta difusa de los ensambles neuronales vinculada a las disfunciones en la memoria, en el GD y CA3, es restituida gracias a limitar su expresión y recobrar la escasez de su codificación, con lo cual se detiene, hasta cierto punto, la degeneración provocada por la excitotoxicidad permitiendo que los ensambles celulares se activen eficazmente y coadyuven, ya que sobre estos se cimentarán los cambios plásticos, al

fortalecimiento y/o la formación o de nuevos ciclos de fase que compensen los que ya se perdieron.

Cuestiones a Considerar en Futuras Investigaciones.

Debe ser notado, sin embargo, que la memantina fue dada junto con el LPS lo que destaca su capacidad para contrarrestar los efectos de una inflamación temprana; habría que ver si funciona de igual manera ante un proceso mas largo de neuroinflamación. También es importante determinar como afecta la memantina en la comunicación entre las distintas vías de entrada del hipocampo, como estas participan en las interacciones inflamatorias presentes dentro del circuito hipocampal.

En general la memantina representa un avance en los tratamientos tradicionales con drogas anti-inflamatorias. A diferencia de estos tratamientos que por lo regular suprimen toda microglía, la memantina se dirige sobre la microglía activada, dejando viva a las demás células de este tipo vivas y con capacidad para responder a otros daños cerebrales. El efecto este fármaco sobre la plasticidad sináptica durante la neuroinflamación y su habilidad para restaurar el adecuado dialogo neurona-glia, sugiere que las aproximaciones farmacológicas pueden ser útiles en condiciones inflamatorias cerebrales, las cuales son neuropatogénicas, no solo la del Alzheimer, sino también el traumatismo cefálico, autismo, síndrome de Down y en enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple.

El enfoque para afrontar tales padecimientos, desde este punto de vista, es tanto más eficaz cuanto que introduce distintos niveles de análisis que implican la intervención de diversas disciplinas científicas (biología, psicología, medicina, etc), que podrían ir desarrollando cada aspecto del problema en su propio terreno teórico.

BIBLIOGRAFÍA

Aisen PS, Davis KL. (1994). Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: implications for therapy. *Am J Psychiatry*. 151(8):1105-13.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich B, Finch CE, Frautschy S, Griffin WST, Hampel H, Landreth G, McGeer PL, Mrak R, MacKenzie I, O Banion K, Pachter J, Pasinetti G. (2000) Inflammation in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.

Albin RL, Greenamyre JT. (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 42:733-738.

Amaral DG, Witter MP. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 31(3):571-91.

Barger SW, Basile AS (2001) Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *J Neurochem* 76:846-854.

Barnes CA, Danysz W, Parsons CG (1996). Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. *Euro J Neurosci* 8:565-571.

Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. (2001). Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 39(5-6):381-91.

Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF alpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4:702-710.

Bliss TV, Lomo T. (1970). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232(2):331-56.

Braak H, Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl).* 82(4):239-59.

Bramham CR, & Messaoudi E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 76(2):99-125.

Brown GC, Bal-Price A. (2003). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 27:325-355.

Burke SN, Barnes CA. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci.* 7(1):30-40.

Burwell RD, Witter MP, Amaral DG. (1995). Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus.* 5(5):390-408.

Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE. (2001). In vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet.* 385:461-467.

Chawla MK, Guzowsky JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA. (2005). Sparse, environmentally selective expression of ••• RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus* 15:579-586.

Claiborne BJ, Xiang Z, Brown TH. (1993). Hippocampal circuitry complicates analysis of long-term potentiation in mossy fiber synapses. *Hippocampus*. 3(2):115-21.

Colicos MA, Dixon CE, Dash PK. (1996). Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: possible role in memory deficits. *Brain Res.* 739(1-2):111-9.

Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C. (2002). Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience*. 112(1):7-11.

Creeley C, Wozniak DF, Labruyere J, Taylor GT, Olney JW. (2006). Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci*. 26(15):3923-32.

Cummings JL. (2003). Toward a molecular neuropsychiatry of neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*. 54(2):147-54.

Danysz W, Parson CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G. (1997). Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents –preclinical studies. *Neurosci Biobehav*. 21:455-468.

De Jong EK, Dijkstra IM, Hensens M, Brouwer N, van Amerongen M, Liem RSB, Boddeke HWGM, Biber K (2005). Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *J Neurosci* 25:7548-7557.

De Simone R, Ajmone-Cat MA, Tirassa P, Minghetti L. (2003). Apoptotic PC12 cells exposing phosphatidylserine promote the production of anti-inflammatory and neuroprotective molecules by microglial cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62(2):208-16.

Donai H, Sugiura H, Ara D, Yoshimura Y, Yamagata K, Yamauchi. (2003). Interaction of Arc with CaM kinase II and stimulation of neurite extension by Arc in neuroblastoma cells expressing CaM kinase II. *Neurosci Res.* 47(4):399-408.

EURODEM (Study-II, 1999) Prevalencia de demencia tipo Alzheimer en Europa

Fassbender K, Walter S, Kuhl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Salder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Staufenbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K. (2004). The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J.* 18(1):203-5.

Floden AM, Li S, Combs CK. (2005). Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J Neurosci.* 25(10):2566-75.

Gallagher M, Rapp PR. (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu Rev Psychol.* 48:339-70.

Germano C, Kinsella GJ. (2005). Working memory and learning in early Alzheimer's disease. *Neuropsychol Rev.* 15(1):1-10.

Goebel DJ, Poosch MS. (2001) Transient down-regulation of NMDA receptor subunit gene expression in the rat retina following NMDA-induced neurotoxicity is attenuated in the presence of the non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801. *Exp Eye Res.* 72(5):547-58.

Goldman WP, Price JL, Storandt M, Grant EA, McKeel DW Jr, Rubin EH, Morris JC. (2001) Absence of cognitive impairment or decline in preclinical Alzheimer's disease. *Neurology*. 56(3):361-7.

Gothard KM, Hoffman KL, Battaglia FP, McNaughton BL. (2001) Dentate gyrus and ca1 ensemble activity during spatial reference frame shifts in the presence and absence of visual input. *J Neurosci* 21:7284-92.

Gottlieb M, Matute C. (1997). Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 17(3):290-300.

Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrazek RE. (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's Disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 8:65-72.

Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM. (2003). Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 60(5):729-36.

Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2:1120-1124.

Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. (2000). Inhibition of activity-dependent *Arc* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci*. 20:3993-4001.

Hanisch UK, Quirion R. (1995). Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. *Brain Res Brain Res Rev.* 21(3):246-84.

Hardy JA, Higgins GA. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054):184-5.

Hauss-Werzniak B, Dobrzanski P, Stoehr JD, Wenk GL. (1998) Chronic inflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer disease. *Brain Res* 780:294-303.

Hauss-Wegrzyniak B Lynch MA, Vraniak PD, Wenk GL. (2002) Chronic brain inflammation results in cell loss in the entorhinal cortex and impaired LTP in perforant path-granule cell synapses. *Exp Neurol.* 176:336-41.

Hebb D. "The organization of behavior; A neuropsychological theory"
New York: J. Wiley 1964c1949.

Hirayama M, Kuriyama M (2001) MK-801 is cytotoxic to microglia in vitro and its cytotoxicity is attenuated by glutamate, other excitotoxic agents and atropine Possible presence of glutamate receptor and muscarinic receptor on microglia. *Brain Res.* 897:204-206.

Jeffery KJ, Hayman R. (2004). Plasticity of the hippocampal place cell representation. *Neurosci*;15(5):309-31.

Jung MW, McNaughton BL (1993) Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* 3:165-182.

Kesner RP, Lee I, Gilbert P. (2004). A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Neurosci.*15(5):333-51.

Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg G (1990). Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J Neurosci* 26:278-287.

Lashley Karl S. (1922). "A Psychological study of motion pictures in relation to venereal disease campaigns". United States Interdepartmental social hygiene board.

Lee H, Villacreses NE, Rapoport SI, Rosenberger TA (2004) In vivo imaging detects a transient increase in brain arachidonic acid metabolism: a potential marker of neuroinflammation. *J Neurochem* 91:936-945.

Lee S-T, Chu K, Jung K-H, Kim J, Kim E-H, Kim S-J, Sinn D-I, Ko S-Y, Kim M, Roh J-K (2005). Memantine reduces hematoma expansion in experimental intracerebral hemorrhage, resulting in functional improvement. *J Cereb Blood Flow Metab in press*.

Leutgeb S, Leutgeb JK, Treves A, Moser MB, Moser EI. (2004). Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science*. 27;305(5688):1295-8.

Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Nat Acad Sci USA* 92:5734-5738.

Lipton S.A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 5(2):160-70.

Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*. 14:433-45.

Marr D. (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 262: 23±81

McNaughton BL, Barnes CA, Meltzer J, Sutherland RJ. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *J Neurosci* 76(3):485-96.

McNaughton BL, Barnes CA, Gerrard JL, Gothard K, Jung NW, Knierim JJ, Kudrimoti H, Qin Y, Skaggs WE, Suster M, Weaver KL. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *J Exp Biol* 199:173-185.

Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. (2002). Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res* 958(1):210-21.

Milner B (1966). Amnesia following operation on the temporal lobes. Whitty CWM, Zanzwill OL, eds. *Amnesia*. London: Butterworths. 109-133.

Minghetti L. (2005). Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 18(3):315-21.

Mobius H. J, Stoffer A (2003) Memantine in vascular dementia. *Internacional psychogediatrics suppl* 1:207-213.

Molinuevo J. Lado A. (2005) Eficacia de la memantina en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Neurología* Vol. 20 Nº 10 pag. 686-91

Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. (1995). Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum Pathol* 26(8):816-23.

Mrak RE, Griffin WS (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 26:349-354.

Neumann H. (2001). Control of glial immune function by neurons. *Glia*. 36(2):1919.

O'Keefe J, Dostrovsky J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34(1):171-5.

O'Keefe John & Nadel Lynn (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press.

Parsons CG, Quack G, Bresink I, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W, Krzascik P, Hartmann S, Danysz W (1995). Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 34:1239-1258.

Perry VH, Cunningham C, Boche D. (2002) Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Curr Opin Neurol.* 15(3):349-54.

Perry VH. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun.* 18(5):407-13.

Petersen RC. (1998). Clinical subtypes of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord. Suppl* 3:16-24.

Polazzi E, Contestabile A (2002) Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 13:221 -242.

Price JL, Morris JC. (2004) So what if tangles precede plaques? *Neurobiol Aging.* 25(6):721-746.

Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. (2005) Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* 25(7):1761-68.

Rogawski MA, Wenk GL. (2003). The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug*. 9:275-308.

Rosenzweig M, Leiman A. "Psicología Fisiológica"
Mc Garw-Hill Colombia 2004.

Rosi S, McGann K, Hauss-Werzniak B, Wenk GL. (2003). Potential role of A2b receptor in the reduction of microglial activation pathway in an Alzheimer disease model. *J Neurochem* 86:220-226.

Rosi S, Ramírez-Amaya V, McGann K, Hauss-Werzniak B, Wenk GL. (2004). Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. *J Neuroinflamm* 1:12-20

Rosi S, Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Worley PF, Barnes CA, Wenk GL (2005) Neuroinflammation alters the hippocampal pattern of behaviorally induced Arc expression. *J Neurosci* 25:723-731.

Rossum D, Hanisch UK. (2004). Microglia. *Metab Brain Dis*. 19(3-4):393-411.

Sakurai Y. (1999) How do cell assemblies encode information in the brain?
Neurosci Biobehav Rev 23:785-796.

Scheff SW, Price DA. (2003) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiology of Aging* 24:1029-1046.

Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J (2004). Cholinergic modulation of microglia activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem* 89:337-343.

Small SA, Chawla MK, Buonocore M, Rapp, Barnes CA (2004). Imaging correlates of brain function in monkeys and rats is dates hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7181-6.

Steward O, Worley PF (2001) Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30:227-240.

Tolman Edward C. (1948) *Cognitive maps in rats and men.* New York.

Vazdarjanova A, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF, Guzowski JF (2002) Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. *J Neurosci* 22:10067-10071.

Vazdarjanova A, Guzowski JF (2004) Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidences for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci* 24: 6489-6496

Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M (2003) Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 23:8692-8700.

Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Stabuli U, Kausselmann G, Bundman M, Khul D (2001) Arc3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP protein Kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci* 21:5484-5493.

Wenk GL, Stoehr JD, Mobley SL, Gurney J, Morris RJ. (1996). Age-related decrease in vulnerability to excitatory amino acids in the nucleus basalis. *Neurobiol Aging*. 17(1):1-7.

Zajackowski W, Quack G, Danysz W (1996) Infusion of (+) -MK-801 and memantine -- contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion. *Eur J Pharmacol* 296:239-246.