

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**Participación de Receptores Glutamatérgicos, Gabaérgicos y Dopaminérgicos
en el Efecto Neurodegenerativo Inducido por MK801 en Roedores**

Trabajo de Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias de la Salud -Biomedicina-

Christian Luis Bender

CÓRDOBA
REPUBLICA ARGENTINA
2010

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Director:

Dr. Alfredo Lorenzo

Integrantes:

Dra. Hilda Montrull

Dr. José Spada

Artículo 30º del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud
“LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS”

DEDICATORIAS

A mi Mujer

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Severo de Olmos por darme la oportunidad de iniciar con esta tesis y por sus inolvidables charlas científicas y filosóficas que comenzaron a formarme como estudiante de neurociencia.

Al Dr. Alfredo Lorenzo por darme la posibilidad de continuar con mi tesis y aportarme inconmensurables enseñanzas que forjaron mi perspectiva actual como “neurocientífico”.

A la Dra. Soledad de Olmos por enseñarme las técnicas de neurohistología y por su colaboración para mi progreso y las publicaciones de este trabajo.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio quienes me brindaron su afecto y por las decenas de charlas científicas y de vida que han contribuido a mi trabajo y a mi persona; en especial a: Fernando Manzini, German Pereno, Florencia Heredia, Victoria Rozes, Pablo Helguera y Anahí Bignante.

Mención aparte merece Verónica Balaszczuk quién ha colaborado en muchas facetas experimentales de este trabajo y con quien he discutido y formulado hasta el hartazgo cada idea, experimento, resultado, escrito y presentación, que he realizado durante estos maravillosos años de vida juntos.

A mis compañeros y compañeras del Instituto Ferreyra que han contribuido con sus conocimientos o donación de animales a la consecución de esta tesis. Específicamente a: Ximena Caeiro, Flavia Bolati, Cristina Arias, Ivan Mestres y Luciano Ponce.

A colegas de otras instituciones que colaboraron; en especial a Mauricio Rassetto quien hizo las determinaciones de aminoácidos, Nicolás Unsain quien me enseñó la canulación estereotaxica y realizó gestiones para que yo pudiera utilizar el bioterio de la Escuela de Biología, y Federico Langer quien corrigió atentamente la redacción del manuscrito.

Al Dr. Marcelo Rubinstein por concedernos los ratones y por permitirnos trabajar en su laboratorio. En especial a Elena Avale, quien preparó los ratones transgénicos que se utilizaron para esta tesis.

Al tribunal de Seguimiento, el Dr. José Spada y la Dra. Hilda Montrull quienes siempre estuvieron muy predispuestos para las reuniones de tesis, en especial Hilda Montrull quien realizó extensas correcciones al manuscrito final.

Al Instituto Ferreyra en su conjunto por contribuir, a través de sus investigadores y personal técnico, al funcionamiento de nuestra institución. Quisiera destacar a Roberto Ramallo y Silvina Ferrer por su eficiencia y predisposición para ayudar.

A los organismos de financiación que permitieron mi formación y la consecución de este trabajo de investigación: CONICET, FONCYT, FUNINAR y CEDIQUIFA.

ÍNDICE

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....	pag. 12
Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	pag. 28
Capítulo 3: RESULTADOS.....	pag. 43
Capítulo 4: DISCUSIÓN.....	pag. 65
Capítulo 5: BIBLIOGRAFÍA.....	pag. 81

ABREVIATURAS

A-Cu-Ag: amino-cupo-argéntica

AMPA: ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil4-isoxazolpropiónico (- α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid)

a-NMDA: antagonista/s de receptor/es NMDA

CA1: cuerno de amon 1 (área del hipocampo)

CaEDTA: edetato de calcio (calcium ethylene-diamine tetraacetic acid)

DMSO: dimetil sulfóxido

DNQX: 6,7-Dinitroquinoxalina-2,3(1H,4H)-diona (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione)

e.g. por ejemplo (exempli gratia)

FJ-B: fluoro jade B

GABA: ácido gamma-amino-butirico (gamma-amino butyric acid)

h.: hora/s

HPLC: cromatografía líquida de alta presión (high pressure liquid chromatography)

HSP70: proteína de shock térmico 70 (heat shock protein 70)

i.c.v. intracerebroventricular

i.e. es decir (Id est)

i.p. intraperitoneal

KA: kainato

KET: ketamina

KO: carente de una proteína por delección genética (knockout)

KOD2: KO del receptor dopaminérgico D2

KOD4: KO del receptor dopaminérgico D4

M \pm EE: media \pm error estándar

MK801: maleato de dizocilpina (dizocilpine maleate, (+) -5-Methyl -10, 11 -dihydro-5H-dibenzo [a,d] cyclohepten-5, 10-imine hydrogen maleate, RBI)

MOB: bulbo olfatorio principal (mean olfactory bulb)

NASPM: 1-Naptilacetil espermina (1-Naphthylacetyl spermine)

NMDA: ácido N-metil-D-aspartato (N-methyl-D-aspartic acid)

p: probabilidad de error de tipo I

PBS: buffer fosfato salina

PCP: fenciclidina (phencyclidine)

Pir: corteza piriforme

PLCo: núcleo amigdalino cortical posterolateral (posterolateral amydaloi nucleus)

RSC: corteza retrosplenial (retrosplenial cortex)

RESUMEN

El maleato de dizocilpina (MK801) es un antagonista de los receptores glutamatérgicos NMDA (α -NMDA) ampliamente utilizado en la investigación biomédica básica. Las drogas con estas propiedades farmacológicas tienen múltiples aplicaciones: desde anestésicos (óxido nitroso, ketamina), pasando por drogas de abuso (fenciclidina, ketamina, óxido nitroso, dextrometorfano, MK801), modelos animales de esquizofrenia (MK801, ketamina) y hasta posibles terapéuticos para diversas condiciones neurológicas (memantina, dextrometorfano). En este contexto, el descubrimiento de que los α -NMDA inducen neurodegeneración en la corteza retrosplenial (RSC) y otras regiones cortico- limbicas en animales experimentales generó conmoción ante la posibilidad de que tales efectos ocurran también en seres humanos. El mecanismo mediante el cual los α -NMDA provocan muerte neuronal es desconocido, aunque evidencias indirectas indican que podrían estar implicadas alteraciones en la transmisión dopaminérgica, gabaérgica y glutamatérgica.

Para indagar la participación de receptores dopaminérgicos (D2 y D4), gabaérgicos (GABA-A) y glutamatérgicos (AMPA/KA, NMDA) en la muerte neuronal inducida por MK801, se realizaron aplicaciones de fármacos de acción específica que modulan los receptores de interés *in vivo* en ratas adultas y la posterior valoración neurohistológica con técnicas específicas para la detección de muerte neuronal. La combinación de administraciones sistémicas de MK801 con microinyecciones intracerebrales de las drogas putativamente moduladoras del efecto neurodegenerativo, evita posibles interacciones farmacocinéticas y provee especificidad neuroanatómica. Complementariamente, mediante cromatografía se midieron los niveles de GABA y glutamato en homogenatos de corteza cerebral, se aplicó un quelante de zinc en la RSC y se trabajó con ratones transgénicos que carecen de receptores dopaminérgicos.

Los principales hallazgos mostraron que la muerte neuronal en la RSC fue significativamente reducida por la administración sistémica y local de agonistas GABA-A (tiopental y muscimol), aún hasta diez horas después de iniciada la intoxicación con MK801. Por otra parte, la administración del antagonista GABA-A picrotoxina no alteró la toxicidad del MK801 sugiriendo que la falta de inhibición gabaérgica no es suficiente para disparar el efecto neurotóxico. La infusión local de MK801 no incrementó la toxicidad provocada por la aplicación sistémica indicando que la muerte neuronal no es provocada por el bloqueo de receptores NMDA en la RSC. En contraste, la neurodegeneración en RSC fue fuertemente inhibida por el bloqueo de receptores AMPA/KA (con DNQX) y, en menor medida, con el antagonismo de receptores AMPA/KA permeables al calcio (con NASPM), hasta 10 horas después de la administración del MK801. Asimismo, la aplicación local (RSC) de ácido kaínico y AMPA (agonistas AMPA/KA) provocó un patrón

de muerte neuronal que emuló al inducido por MK801. Además, los niveles de glutamato, pero no de GABA, se encontraron disminuidos en la RSC de los animales intoxicados con MK801 ocho horas después de la administración. En conjunto, estos datos sugieren que la muerte neuronal inducida por MK801 en RSC es causada por un mecanismo excitotóxico dependiente de la sobreactivación de receptores AMPA/KA.

Los experimentos realizados en ratones carentes en receptores D2 o D4 y con el antagonista dopaminérgico haloperidol en ratas, indicaron que estos receptores no intervienen en la degeneración inducida por MK801 en la RSC. Por otro lado, el haloperidol mostró efecto protector en el núcleo amigdalino cortical posterolateral (PLCo) mientras que tiopental, muscimol y DNQX, que mostraron acción protectora en la RSC, no afectaron el cuadro degenerativo en el PLCo, sugiriendo que en estas estructuras operan distintos mecanismos neurotóxicos. Adicionalmente, los experimentos con ratones revelaron inesperadas diferencias entre especies que fueron abordadas en mayor detalle demostrándose que distintas cepas de ratones normales carecen del dimorfismo sexual en los efectos tóxicos del MK801 observados en ratas, al tiempo que son mucho menos sensibles a los efectos neurodegenerativos de la droga.

En síntesis, los datos proveen evidencia de que diferentes mecanismos neurotóxicos operan en la RSC y el PLCo; y que la muerte neuronal inducida por MK801 en la RSC es mediada por una hiperfunción de receptores AMPA/KA, mientras que la hipofunción de receptores GABA-A o estimulación de receptores D2 y D4 no son suficientes/necesarios para dicho efecto. Los aportes a la comprensión del mecanismo mediante el cual α -NMDA inducen neurodegeneración son discutidos en relación con la neuropatología experimental básica, como así también, los potenciales aportes a la salud humana en los campos de la toxicología, neurofarmacología y psiquiatría biológica.

ABSTRACT

Dizocilpine maleate (MK801) is a NMDA glutamatergic receptors antagonist (NMDA-a) widely used in basic biomedical research. The drugs with these pharmacological properties have multiple uses: ranging from anaesthetics (nitrous oxide, ketamine), to drugs of abuse (phencyclidine, ketamine, nitrous oxide, dextrometorphan, MK801), animal models of schizophrenia (MK801, ketamine) to possible therapeutics to diverse neurological conditions (memantine, dextrometorphan). In this context, the discovery that NMDA-a induce neurodegeneration in the retrosplenial cortex (RSC) and other cortico-limbic regions in experimental animals generated alarmism since this may also happen to humans. The mechanism through which NMDA-a cause neuronal death is unknown, although indirect evidences indicate that alterations in dopaminergic, gabaergic and glutamatergic neurotransmission may be implicated.

To address the implication of dopaminergic (D2 and D4), gabaergic (GABA-A), and glutamatergic (NMDA, AMPA/KA) receptors in the neuronal death induced by MK801, applications of selective drugs that modulate the receptors of interest in adult rats *in vivo* and posterior evaluation with specific techniques to detection of neuronal death were done. The combination of systemic administration of MK801 and intracerebral microinjections of the drugs putatively modulators of neurodegenerative effect, avoid pharmacokinetic interactions and provide neuroanatomical specificity. Complementary, the levels of GABA and glutamate in cortical homogenates were measured through chromatography, a zinc chelator in RSC was applied, and transgenic mice lacking dopaminergic receptors were utilized.

The main findings showed that neuronal death in RSC was significantly reduced by the systemic and local administration of GABA-A agonists (thiopental and muscimol), even until ten hours after the beginning of intoxication with MK801. On the other hand, the administration of the GABA-A antagonist picrotoxin did not alter the MK801 toxicity, suggesting that the lack of gabaergic inhibition is not enough to trigger the neurotoxic effect. The local infusion of MK801 did not increase the toxicity induced by systemic administration indicating that neuronal death is not produced by NMDA blocking in the RSC. In contrast, the neurodegeneration in RSC was strongly inhibited by blocking of AMPA/KA receptors (with DNQX) and, to a lesser extent, by the antagonism of calcium permeable AMPA/KA receptors (with NASPM), until ten hours after MK801 administration. Moreover, the kainic acid and AMPA local application (RSC) induced a pattern of neuronal death, which emulated the MK801 induced neurotoxicity. In addition, levels of glutamate, but no GABA, in RSC of MK801 intoxicated animals at eight hours after administration were diminished. Collectively, the data indicated that MK801-induced neuronal death in RSC is caused by an excitotoxic mechanism based on AMPA/KA receptors overactivation.

Experiments performed in mice lacking D2 or D4 receptors and with the dopaminergic antagonist haloperidol in rats, indicated that these receptors do not mediate the MK801 induced degeneration in the RSC. On the other hand, haloperidol showed a strong protective effect in the posterolateral cortical amygdaloid nucleus (PLCo) while thiopental, muscimol and DNQX, that protected RSC neurons, did not affected the degenerative pattern in PLCo, suggesting that different neurotoxic mechanisms operated in these structures. In addition, the experiments performed with mice revealed unexpected species differences that were further addressed. These studies demonstrated that different strains of normal mice lacking the sex dimorphism in the MK801 toxic effects observed in rats, and that they are much less sensitive than rats to the neurodegenerative effects of the drug.

In summary, the data provide evidences that different neurotoxic mechanisms operate in RSC and PLCo; and that MK801 induced neuronal death in the RSC is mediated by a hiperfunction of AMPA/KA receptors, while the hypofunction of GABA-A receptors or D2 and D4 stimulation are not enough/necessary to MK801-unduced-neurodegeneration. The contributions to the comprehension of mechanism whereby NMDA-a induced neurodegeneration are discussed in relation to basic experimental neuropathology, as well as, the potential contributions to human health in the field of toxicology, neuropharmacology and biological psychiatry.

Capítulo 1
INTRODUCCIÓN

Antagonistas NMDA: anestésicos, drogas de abuso psicodélicas y potenciales terapéuticos

El uso de sustancias psicotrópicas con fines religiosos, medicinales o recreativos, es una práctica tan antigua como la civilización misma. Con el progreso de la ciencia y el desarrollo de la industria farmacéutica en la era moderna, la producción y el consumo de drogas que actúan en el sistema nervioso central no hizo más que incrementarse hasta límites insospechados (61).

Junto a los efectos buscados –sean estos terapéuticos o recreacionales-, ningún psicotrópico está exento de reacciones indeseadas o adversas. Algunas de estas respuestas son transitorias y tolerables pero otras pueden ser de extrema gravedad, como el daño irreversible de células cerebrales. Es por ello que conocer los mecanismos neuroquímicos que generan los efectos indeseables es una de las tareas centrales de la investigación biomédica, con el objetivo de poder evitar o aminorar sus consecuencias negativas. Pero los estudios neurotoxicológicos de una droga tienen una importancia incluso mayor; entender como una sustancia provoca un efecto adverso en el cerebro implica incrementar el conocimiento sobre el funcionamiento del sistema nervioso tanto en condiciones normales como patológicas.

Entre las decenas de fármacos que se han desarrollado con fines médicos, sin dudas un hallazgo que trascendería la historia fue la síntesis de dos nuevos y prometedores anestésicos: la fenciclidina (PCP) y la ketamina (KET). La PCP fue comercializada en la década del cincuenta por la compañía farmacéutica Parke-Davis (95). Una década después, el farmacólogo Stevens desarrolló la KET que fue usada por primera vez en la práctica clínica en 1965 por Edward Domino (52). Estas drogas eran anestésicas revolucionarios por cuanto lograban un alto nivel de inconsciencia y analgesia con un margen de seguridad inusualmente alto debido a que, contrario a otros anestésicos, no provocaban depresión cardiorrespiratoria. Sin embargo, no tardaron en identificarse efectos indeseables; en particular, se demostró que estas sustancias provocaban “reacciones de emergencia” al iniciar el periodo de recuperación postanestésica. Tales reacciones, reportadas por los médicos, consistían en alucinaciones y estados delirantes que vivenciaban los pacientes que, muchas veces, desencadenaban conductas violentas e irracionales (133, 188, 190).

Estos efectos fueron muy marcados con la PCP pero menos intensos y frecuentes con la KET lo que valió para que no fuera totalmente discontinuada como ocurrió con la PCP. La KET paso a ser un fármaco de elección en la practica veterinaria hasta nuestros días y, aunque en algunos países el uso quirúrgico en humanos esta prohibido, en muchos otros (incluido Argentina) continúa en circulación legal en los ámbitos hospitalarios. A pesar de que la PCP fue rápidamente prohibida, esto no fue un

impedimento para que se siguiera sintetizando en el mercado ilegal, debido a su potencial adictivo y porque sus efectos psicodélicos son buscados por miles de usuarios, constituyéndose en una droga de abuso de alta prevalencia (43, 141, 153). Al respecto, estudios epidemiológicos del Instituto Nacional de Drogas de Abuso de Estados Unidos indicaron que en el 2006, casi 7 millones de personas (2.7 por ciento de la población) informaron haber usado PCP alguna vez en la vida (152).

El uso recreacional de KET y otras drogas similares es aún más elevado debido a que se sigue produciendo legalmente y porque los efectos son menos potentes y más “controlables” que con la PCP (41, 95, 210). Asimismo, existen muchos consumidores fortuitos de estas sustancias ya que, a causa de su bajo costo de producción, son utilizados en la adulteración de otras drogas de abuso con efectos algo similares, como la 3,4-metilendioximetanfetamina (más conocida como éxtasis) y la dietilamida del ácido lisérgico (95). En Argentina no hay cifras oficiales respecto del consumo pero publicaciones periodísticas reflejan que el uso y abuso de la KET está ampliamente extendido en nuestro país (51, 130).

En el año 1979, estudios de farmacología molecular determinaron que estas drogas son antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), los cuales participan en la neurotransmisión glutamatérgicas (203). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del encéfalo; se libera en más de la mitad de las sinapsis existentes en el cerebro y regula la actividad de millones de neuronas actuando a través de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores metabotrópicos actúan a través de proteínas heterotriméricas G y sistemas de segundos mensajeros existiendo al menos 8 formas distintas. Los receptores ionotrópicos controlan de manera directa canales de sodio y calcio que regulan la excitabilidad de la membrana y, con ello, la comunicación nerviosa. Estos receptores son clasificados en dos grandes familias: los no-NMDA (AMPA y KA) y los NMDA que son los más amplia y densamente distribuidos (109, 165) (Figura 1).

Concomitante a su ubicuidad e importancia funcional, alteraciones en la interacción del glutamato con el receptor NMDA han sido implicadas en diferentes patologías del sistema nervioso, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas más acuciantes tales como el Alzheimer y la esquizofrenia (29, 80, 86, 131, 215). Por ello, la comunidad científica y las compañías farmacéuticas continúan con los esfuerzos para desarrollar nuevos fármacos capaces de modular estos receptores. Así, surgieron otros como el maleato de dizocilpina (MK801) y la memantina, al tiempo que comenzó a determinarse que otras moléculas conocidas de antaño, como el óxido nitroso, tienen como acción farmacológica principal el antagonismo de los receptores NMDA (103).

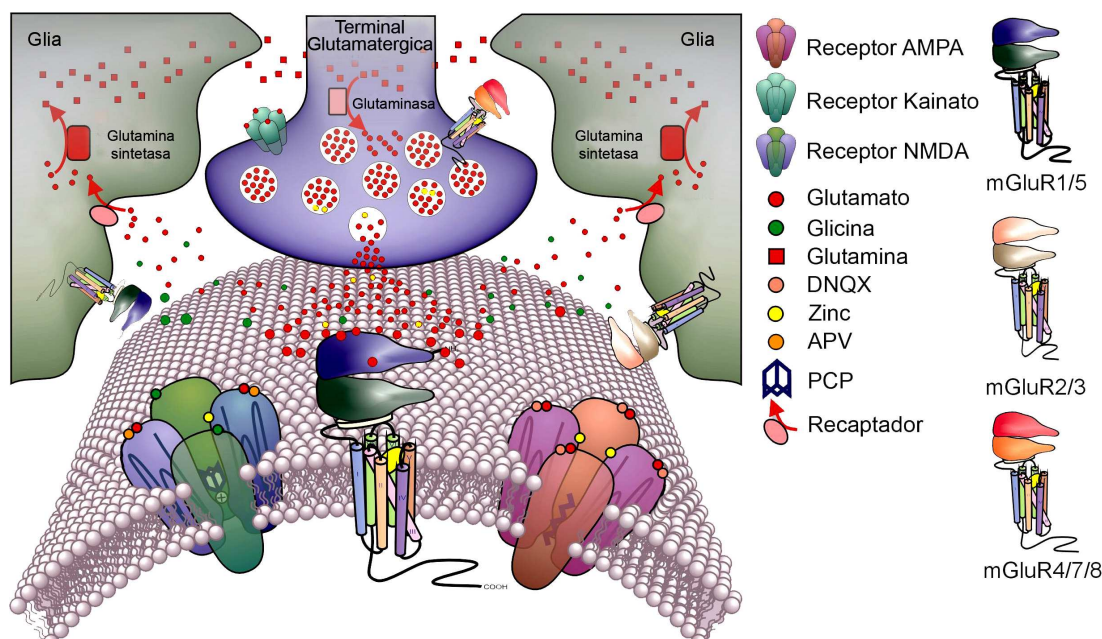


Fig. 1: Representación de una sinapsis glutamatergica. Se muestran los principales componentes incluyendo: 1) una terminal glutamatergica conteniendo vesículas con el neurotransmisor glutamato y zinc, la enzima glutaminasa que transforma la glutamina en glutamato, y la presencia de autoreceptores kainato y metabotrópicos (mGluR/7/8); 2) células gliales que contienen el recaptador del glutamato mediante el cual se elimina del espacio sináptico, y la enzima glutamina sintetasa que transforma el glutamato en glutamina la cual es transportada a la neurona donde es convertida en glutamato; 3) la membrana postsináptica (de una espina dendrítica) donde se encuentran los receptores metabotrópicos e inotrópicos en los que se señalan los sitios de unión de distintos ligandos como el glutamato, zinc, glicina (co agonista endógeno del receptor NMDA), DNQX (antagonista competitivo de receptores AMPA/KA), APV (antagonista NMDA competitivo), PCP (antagonista NMDA no competitivo). Nota: los receptores kainato también se expresan en la postsinapsis y son antagonizados por el DNQX aunque este dato no aparece en la grafica por razones de simplificación. Adaptado de <http://www.chrisparsons.de/Chris/glutamate.htm>.

Nuevas aplicaciones y nuevos efectos adversos de antagonistas NMDA: daño neuronal irreversible

Existen enfermedades neurológicas en las que una hiperfunción (e.g. sobreestimulación) de los receptores NMDA es un componente importante de la fisiopatología subyacente. Para tales casos, los fármacos antagonistas de los receptores NMDA (a-NMDA) son considerados potenciales agentes terapéuticos (108). De hecho, investigaciones en modelos animales de dolor neuropático (40, 42), isquemia (25, 205), abstinencia al etanol (16, 91), epilepsia (8, 207) entre otros, muestran mejorías importantes con los a-NMDA.

Sin embargo, su posible aplicación al campo terapéutico se vio nuevamente limitada luego del paradójico hallazgo de que estos compuestos pueden, simultáneamente, provocar *muerte neuronal* en áreas córtico-límbicas de animales experimentales. Estos trabajos pioneros realizados por Olney y colaboradores en el año 1989 (162) generaron gran inquietud ya que mientras que los efectos psicotomiméticos

(alucinaciones y delirios) son transitorios, los efectos neurodegenerativos son irreversibles.

Posteriormente, diversos laboratorios confirmaron el efecto neurotóxico inducido por a-NMDA con diferentes técnicas histopatológicas tales como: hematoxilina-eosina/azul de metileno -para la visualización de vacuolas y cromofilia indicativa de necrosis- (7, 72, 73, 75, 162, 212); histoquímica/inmunohistoquímica -para la detección de reactividad de la microglía, astrocitos y de proteínas inducibles ante la presencia de un agente neurotóxico- (73, 75, 149, 174, 183, 184); técnicas para detectar fragmentación del ácido desoxirribonucleico- (106, 137); y técnicas de plata para la detección de argirofilia indicativa de neurodegeneración (21, 22, 32, 45, 46, 57, 59, 73, 74, 89, 211, 212).

En conjunto, dichos trabajos demostraron dos grandes tipos de neurotoxicidad inducida por a-NMDA dependiendo de las dosis administradas, los efectos neurotóxicos reversibles (estrés neuronal) y los efectos neurotóxicos irreversibles (neurodegeneración). A dosis bajas, los a-NMDA inducen vacuolización de las neuronas de la corteza retrosplenial (RSC) en las capas IV y Va dentro de las primeras horas (1-8 h) luego de la administración de la droga la cual disminuye gradualmente hasta desaparecer luego de transcurridas 24 horas. Estudios de microscopía electrónica comprobaron que las vacuolas son mitocondrias y ribosomas en estado edematoso. Otro indicador que se manifiesta con dosis bajas es un aumento en la expresión de la proteína de shock térmico 70 (heat shock protein 70 -HSP70-), la cual se induce cuando la neurona ha sido injuriada y se piensa que participaría en procesos de reparación celular (175). Ambos fenómenos son considerados indicadores de *neurotoxicidad reversible* porque desaparecen rápidamente cuando el fármaco se ha eliminado del organismo y porque no involucran muerte neuronal. Por el contrario, una dosis alta o tratamientos subcrónicos de dosis moderadas, generan muerte neuronal en la RSC y también en otras áreas como el hipocampo, la corteza olfatoria, la corteza entorhinal y el núcleo amigdalino cortical posterolateral (PLCo). Dichos efectos son detectados tanto con técnicas de plata como con técnicas de tinción de glía reactiva, los cuales son indicadores directos e indirectos, respectivamente, de neurodegeneración por lo que se consideran *efectos neurotóxicos irreversibles* (161).

Los efectos degenerativos se han encontrado con una gran variedad de a-NMDA incluyendo bloqueantes del receptor que actúan de diferente manera (e.g. antagonistas competitivos y no competitivos) (57). Incluso, también se ha reportado neurodegeneración con los a-NMDA de “mejor perfil” como el óxido nítrico (102) y el fármaco aprobado para estadios moderados y graves de la enfermedad de Alzheimer, la memantina (35). Aunque tales efectos ocurren a dosis elevadas, estas no se alejan demasiado de las administradas en personas. El potencial nocivo de estas drogas se intensifica cuando consideramos que los efectos degenerativos en animales se observan con tan sólo una

dosis mientras que las personas típicamente repiten las administraciones, pudiendo generar efectos acumulativos. Al respecto, estudios de campo indican que los adictos a la PCP consumen durante dos o tres días seguidos ingiriendo dosis de hasta 1 gramo por día (204), lo que equivaldría a 14 mg/kg para una persona de 70 kilos, y los efectos neurotóxicos irreversibles en animales ya se observan con dosis de 10 mg/kg (57, 149).

Si bien en seres humanos no se han realizado estudios *post mortem* o con técnicas de neuroimagen que permitan evaluar daño estructural, las investigaciones neuropsicológicas en consumidores crónicos de estas sustancias revelan déficits cognitivos que sugieren que un daño neuronal ocurre en las personas que usan/abusan de a-NMDA (26, 33, 142-144). Utilizando la batería neuropsicológica de Halstead-Reitan, que evalúa un amplio espectro de funciones mentales (e.g.: comunicación verbal, percepción espacial, capacidad de analizar la información, atención, memoria, formación de conceptos mentales) y que correlaciona con la presencia de daño cerebral, se observó que consumidores crónicos de PCP presentaban peores perfiles que el grupo control. Los principales dominios deteriorados fueron la capacidad de abstracción y las habilidades de integración perceptivo-motoras (26). Es interesante saber que estos consumidores no tenían historia previa de trastornos neurológicos y llevaban una abstinencia promedio de 27 meses, indicativo de un efecto neurotóxico irreversible inducido durante el consumo.

Otros investigadores han aprovechado el consumo voluntario en clubes nocturnos para testear los efectos de la KET tanto en el momento del consumo (intoxicación) como días después, cuando el sujeto ya está libre de la droga, utilizando como controles personas que se han autoadministrado otras sustancias de abuso. En tales estudios, los déficits en memoria semántica y memoria episódica fueron más graves que en los consumidores de otras drogas aún tres días después del consumo (37, 38). Trabajos recientes muestran que los déficits en consumidores frecuentes también involucran a la memoria de trabajo espacial, memoria de reconocimiento y aspectos de la función ejecutiva (143, 144). En estudios longitudinales de más largo plazo, se han reportado persistencia de los déficits en capacidades atencionales y en memoria episódica a pesar de largos periodos sin consumo pero también se advirtió recuperación en varios dominios cognitivos (142), sugiriendo que mecanismos de compensación/reparación podrían contrarrestar parcialmente el daño cerebral.

La investigación de a-NMDA en animales ha sido principalmente guiada por el uso de maleato de dizocilpina, más comúnmente referido con la denominación de MK801. Dicha elección está basada en la alta afinidad y selectividad que tiene este psicotrópico en el bloqueo de los receptores NMDA. El MK801, al igual que la PCP, la KET y la memantina, es un antagonista no competitivo del receptor NMDA que bloquea el canal regulado por este receptor, impidiendo el flujo de iones de calcio y sodio al interior de la membrana que ocurre cuando el glutamato se liga a su sitio de unión (165) (Figura 2).

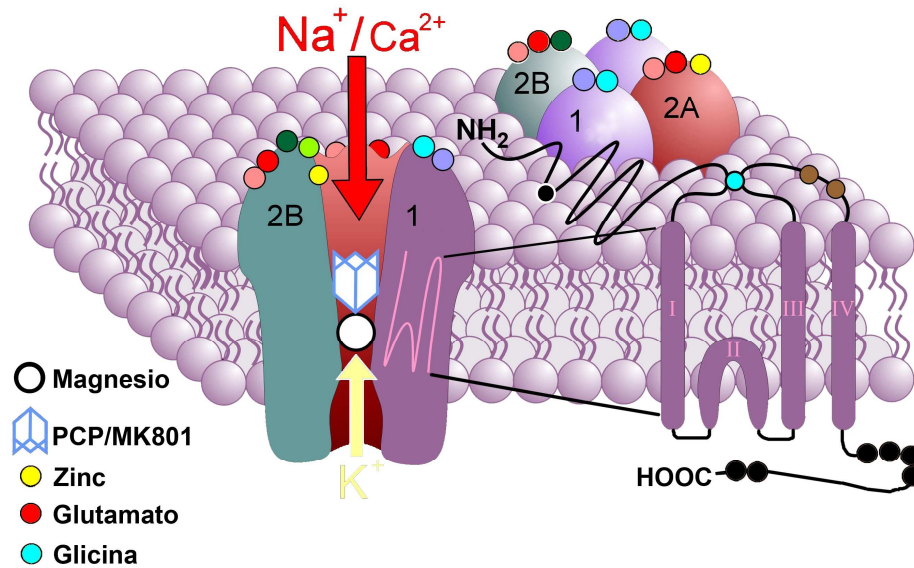


Fig. 2: Representación de un receptor NMDA. El mismo está formado por cuatro subunidades, la NR1 que debe estar presente para la formación de un receptor funcional y las NR2A-D, que conforman un canal permeable al calcio el cual permite el flujo de calcio hacia al interior de la membrana cuando se reúnen las siguientes condiciones: 1) el glutamato se liga al sitio de unión; 2) la glicina o D-serina están en su sitio de unión y; 3) el magnesio ha sido desplazado del poro debido a que la membrana neuronal ha sido despolarizada alejándola del potencial de reposo. Los antagonistas no competitivos del receptor NMDA como PCP/MK801 bloquean el canal de calcio, impidiendo el flujo de iones que ocurre cuando glutamato se liga a su sitio de unión. Adaptado de <http://www.chrisparsons.de/Chris/nmda.htm>

En ratas, las dosis mínimas de MK801 que provocan degeneración son de 0.3 mg/kg (89) principalmente en la RSC en neuronas piramidales de las capas IV y Va. Dosis de 2 mg/kg o más elevadas generan muerte neuronal de mayor magnitud que se extiende también a otras áreas como el PLCo, el hipocampo, la corteza entorhinal, el bulbo olfatorio y la corteza piriforme (21, 57, 59, 73, 89). Tal como acontece en seres humanos, en animales también se han detectado déficits funcionales persistentes varios días o semanas después de la administración de la droga, sugiriendo que los efectos neurodegenerativos afectan significativamente el funcionamiento del cerebro. Por ejemplo, luego de administraciones subcrónicas de PCP en ratas (101) y monos (98) se observan disminuciones en el desempeño de pruebas que requieren memoria de trabajo espacial. También se han observado déficits en procesos de aprendizaje asociativo tanto en ratas como en ratones (60, 100). Efectos de largo plazo en memoria espacial han sido detectados también con sólo una dosis de MK801 y hasta un mes después de la administración (último tiempo evaluado) (128, 211).

En síntesis, la similitud de los déficits funcionales entre animales y seres humanos y la persistencia de los mismos a pesar de transcurrir periodos de abstinencia prolongados sugieren que los cambios degenerativos inducidos por la droga subyacen a estos déficits.

Implicaciones del efecto neurodegenerativo inducido por a-NMDA

Los graves efectos adversos asociados a los a-NMDA que limitaron el potencial uso terapéutico de estas sustancias, al mismo tiempo, incrementaron el interés científico-médico en el estudio de las mismas. Ello se debe a que varios de estos compuestos (e.g. PCP, KET, óxido nítrico, MK801) tienen capacidad adictiva y, por ende, numerosas personas consumen estas sustancias de manera descontrolada, exponiéndose a sus efectos neurotóxicos.

Otro efecto colateral asociado a los a-NMDA que ha suscitado mucho interés es la capacidad de inducir síntomas de la esquizofrenia (alucinaciones, delirios, aplanamiento afectivo, aislamiento social, déficits cognitivos) en sujetos normales y de provocar recaídas en pacientes con esta enfermedad (34, 85, 122). La similitud entre los síntomas inducidos por estas drogas con el síndrome esquizofrénico, junto con otros datos clínicos y experimentales, llevaron a postular que un estado de hipofunción de los receptores NMDA podría desempeñar un rol en desórdenes psicóticos como la esquizofrenia (19, 27, 96, 99, 164). Así, la aplicación de a-NMDA en animales (incluidos los humanos) se transformó en una “herramienta farmacológica” para analizar las consecuencias (comportamentales, neuroquímicas, neurotóxicas, etc) que resultan de disminuir la actividad de los receptores NMDA y explorar los mecanismos que las provocan. La formulación de modelos explicativos de tales mecanismos sirve de base para realizar teorizaciones sobre la fisiopatología de la esquizofrenia.

Si bien este trastorno mental no es típicamente enmarcado dentro de las enfermedades neurodegenerativas (134), hallazgos de los últimos años han reformulado esa visión y actualmente se acepta que en esta patología están involucradas tanto alteraciones del neurodesarrollo como procesos neurodegenerativos que llevarían a un deterioro cognitivo progresivo (6, 36, 48, 70, 170). Es interesante señalar que la principal estructura que presenta cambios neurodegenerativos en animales tratados con a-NMDA, la RSC, exhibe volúmenes menores en sujetos con esquizofrenia comparados con controles normales. Más aún, esta disminución se correlaciona con un desempeño neurocognitivo bajo que caracteriza a una subpoblación de esquizofrénicos con predominancia de síntomas negativos (e.g. déficits cognitivos, aplanamiento afectivo, etc.) y que es altamente incapacitante (138, 139).

En síntesis, entender el mecanismo de los efectos neurodegenerativos inducidos por a-NMDA permitirá formular hipótesis sobre la etiología de los cambios neuropatológicos observados en esquizofrénicos, generando una base racional para la implementación de tratamientos que prevengan tales alteraciones. Asimismo, servirá para el desarrollo de estrategias farmacológicas que permitan mitigar el daño cerebral que

sufrirían los consumidores de este tipo de psicotrópicos y para aprovechar el potencial terapéutico de estos fármacos, evitando sus efectos neurotóxicos indeseados.

Mecanismos que mediarían los efectos neurodegenerativos inducidos por antagonistas NMDA

Aunque los trabajos realizados con a-NMDA son numerosos, poco se conoce acerca de los mecanismos implicados en la acción neurodegenerativa de estas sustancias. Sin embargo, varios indicios permiten inferir que podría tratarse de un fenómeno indirecto, consecuencia de un desbalance tanto en la neurotransmisión inhibitoria como excitatoria. Por ejemplo, se ha demostrado que microinyecciones de MK801 en la RSC no producen vacuolización neuronal ni inducción de HSP70 (69, 200). De ello se infiere que los a-NMDA dañarían las neuronas iniciando su acción en poblaciones neuronales distintas de las que son dañadas. En la misma dirección se encuentra el hecho de que las áreas que presentan neurodegeneración no coinciden con los sitios donde hay mayor densidad de receptores NMDA (58).

Por otro lado, aunque la neurotoxicidad sería un fenómeno indirecto, las evidencias sustentan que el bloqueo del receptor NMDA es el eslabón crítico que inicia la secuencia de eventos que desencadenan la neurotoxicidad. Ello se fundamenta en que existe una correlación directa entre el efecto neurotóxico y la afinidad de los a-NMDA por el sitio de unión al receptor, es decir que a mayor afinidad de la droga mayor degeneración produce (58, 184). Más aún, el patrón neurodegenerativo de diversos a-NMDA (tanto competitivos como no competitivos) es idéntico al resultante de la administración de MK801, que es el de mayor selectividad (57, 163) mientras que ni antagonistas AMPA/KA ni bloqueadores de los canales de calcio ocasionan muerte neuronal (31).

La injuria de las poblaciones neuronales vulnerables sería consecuencia de un proceso conocido como excitotoxicidad, en el cual las neuronas mueren porque sus receptores excitatorios (o despolarizantes) son excesivamente activados (159, 179). Tal conclusión se deriva de estudios con marcadores de la actividad neuronal (c-fos, 2-deoxiglucosa) que muestran una activación prolongada, previa y concomitante, a la aparición de signos degenerativos (45, 56, 81). Las evidencias obtenidas con microscopía electrónica refuerzan esta hipótesis ya que las alteraciones de las organelas neuronales, incluyendo inflamación de los retículos y las mitocondrias así como ruptura de membranas, son similares a las que se observan tras administrar agentes reconocidamente excitotóxicos, tales como el ácido kaínico o el propio glutamato (212). Además, puesto que la sobrecarga intracelular de calcio es considerada un factor esencial

en la excitotoxicidad (159, 179), el hecho que bloqueadores de los canales de calcio previenen la aparición de signos de estrés celular inducidos por α -NMDA (183) apoya la hipótesis de que la muerte neuronal sería consecuencia de una sobre-estimulación de receptores excitatórios.

Sin embargo, el mecanismo excitotóxico de estos agentes sería más complejo que el de otras sustancias porque implica alteraciones de circuitos neuronales y la participación de varios sistemas de neurotransmisión. Diversos trabajos que analizaron la neurotoxicidad reversible inducida por α -NMDA han puesto de manifiesto que esta puede ser prevenida con una variedad de fármacos que modulan diferentes sistemas de neurotransmisión incluyendo el dopaminérgico (4, 49, 78), el serotoninérgico (66, 199), el adrenérgico (64, 104), el colinérgico (69, 163), el gabaérgico (67, 163, 200) y el glutamatérgico (69, 186).

No obstante, existen muy pocos trabajos que específicamente hayan evaluado si estos sistemas están también involucrados en la neurotoxicidad irreversible inducida por α -NMDA. Teniendo en cuenta que tanto los procesos neurodegenerativos inducidos por drogas como los observables en modelos de patologías neurodegenerativas han sido sistemáticamente vinculados a desbalances en el sistema dopaminérgico, gabaérgico y glutamatérgico (3, 18, 84, 125, 173, 195, 196) el presente trabajo se abocó a analizar si dichos sistemas estaban involucrados en la neurodegeneración inducida por MK801.

Participación de receptores dopaminérgicos D2 y D4

Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la gran familia de receptores metabotrópicos que están acoplados a proteínas G, las cuales son modificadas cuando el transmisor se liga al receptor. Como consecuencia de esa modificación se activan segundos mensajeros que funcionan como señales metabólicas para la fosforilación o desfosforilación de otras proteínas celulares, entre ellas los canales iónicos. De esta manera los receptores dopaminérgicos modulan la actividad sináptica y la excitabilidad de la membrana neuronal (194, 195).

Existen 5 tipos de receptores dopaminérgicos que se clasifican en tipo D1 (que comprende los subtipos D1 y D5) los cuales activan la adenilato ciclasa aumentando los niveles intracelulares de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) y tipo D2 (que comprende los subtipos D2, D3, D4), los cuales inhiben la adenilato ciclasa disminuyendo los niveles de AMPc. Las reacciones metabólicas asociadas a la estimulación de los receptores tipo D1 conducen a la despolarización de la membrana neuronal, es decir que son excitatorios; mientras que los receptores tipo D2 hiperpolarizan la membrana y por ello se catalogan como inhibitorios (24) (Figura 3).

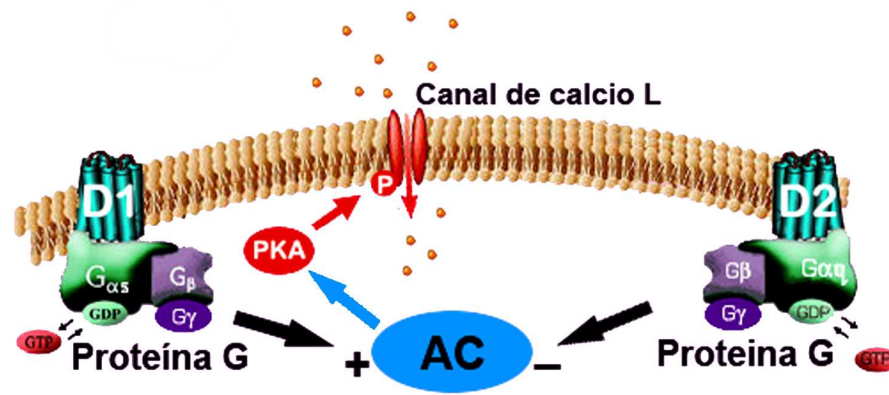


Fig. 3: Representación de receptores dopaminérgicos D1 y D2. Los mismos actúan a través de proteínas heterotrimericas G. Cuando la dopamina se liga al receptor D1, activa una proteína G que estimula la enzima adenilato ciclasa (AC) la cual aumenta el AMP cíclico que activa la proteína quinasa A (PKA) que fosforila receptores de calcio cuyo efecto es la apertura del canal y, con ello, la despolarización de la membrana. La estimulación de receptores D2 ejerce el efecto opuesto ya que están asociados a proteínas G inhibitorias. *Nota:* esta es sólo una de las vías posibles mediante las cuales los receptores D1 aumentan la excitación de la membrana y los receptores D2 la inhiben. Adaptado de Rajadhyaksha & Kosofsky (2005).

Tanto en animales (1, 192) como en humanos (1, 111) la administración de α -NMDA incrementa la liberación de dopamina. En este contexto, es interesante señalar que la aplicación de altas concentraciones de dopamina a cultivos de neuronas corticales (*in vitro*) (3) así como en el estriado de animales intactos (*in vivo*), causa la muerte de las neuronas (87, 173). Asimismo, la anfetamina, la cual aumenta la liberación de la dopamina endógena, induce efectos neurodegenerativos en varias estructuras coincidiendo con el MK801 en la capacidad de inducir muerte neuronal en el PLCo (18). Por otra parte, se ha reportado que la administración de antipsicóticos (los cuales bloquean principalmente los receptores dopaminérgicos D2 y D4) previene la aparición de signos reversibles de estrés celular provocada por α -NMDA en la RSC (78, 148, 185). Sin embargo, se ignora aún si estos receptores dopaminérgicos intervienen en la muerte neuronal inducida por MK801 en alguna de las estructuras que sufren neurodegeneración.

Participación de receptores GABA-A

Los receptores GABA-A pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos ya que parte de su estructura constituye la pared de un canal iónico que se regula por la unión a ligandos en el espacio extracelular. Cuando el neurotransmisor GABA se une a su sitio de reconocimiento abre el canal que es selectivamente permeable al cloro (Cl⁻) que a determinado gradiente electroquímico permite el ingreso del anión, hiperpolarizando la membrana neuronal. Cada receptor GABA-A está formado por cinco subunidades, cada una de las cuales contribuye, mediante una de sus subregiones transmembranales, a

formar la pared del canal de Cl^- (Figura 4). Existen 16 subunidades diferentes para formar el pentámero cuyas múltiples combinaciones generan diversos canales que difieren en sus características farmacológicas y electrofisiológicas (17).

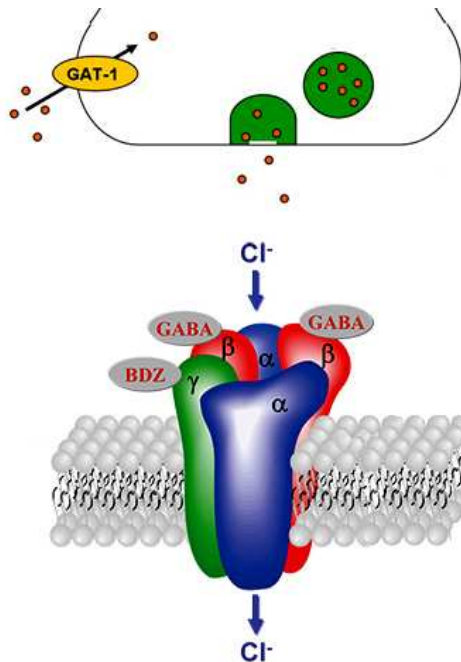


Fig. 4: Representación de un receptor GABA-A. La misma muestra la estructura pentámera del receptor cuyas subunidades forman un canal permeable al cloro (Cl^-). Cuando el neurotransmisor GABA es liberado de las vesículas desde la membrana presináptica hacia el espacio intersináptico, este se liga a sus sitios de unión (en las subunidades beta) y abre el canal permitiendo el ingreso intracelular de Cl^- . En neuronas adultas esto tiene un efecto inhibitorio porque hiperpolariza las membranas. El GAT 1 es un transportador del GABA que lo ingresa a la terminal sináptica rápidamente luego de que el GABA es liberado. BDZ es el sitio de reconocimientos de las benzodiazepinas las cuales aumentan las corrientes iónicas inducidas por el GABA. Adaptado de http://www.niaaa.nih.gov/Resources/GraphicsGallery/Neuroscience/gaba_receptor.htm

Los primeros hallazgos que arrojaron luz acerca del mecanismo mediante el cual α -NMDA inducen efectos neurotóxicos fueron que agonistas GABA-A previenen la vacuolización neuronal y la inducción de HSP70 inducida por α -NMDA en la RSC (163, 183). Reforzando la hipótesis de que el mecanismo es indirecto, se ha reportado prevención de estos signos de estrés celular cuando el agonista GABA-A muscimol se administra en áreas que proyectan hacia la RSC, tales como el tálamo anterior y la banda diagonal de Broca (63, 200). Basados en estas observaciones, Olney y colaboradores propusieron que una activación basal (normal) de receptores NMDA en neuronas gabaérgicas, y la consecuente liberación de GABA, mantiene una inhibición tónica sobre vías excitatorias postsinápticas que convergen en las áreas afectadas. Así, los α -NMDA disminuirían o anularían el control inhibitorio normal, desinhibiendo ciertas vías excitatorias originando hiperactivación de determinadas neuronas que llegada a un punto crítico se volvería excitotóxica. Apoyando esta hipótesis, se ha observado que la administración de α -NMDA aumenta la liberación de glutamato y acetilcolina (113, 140). Este hecho también refuerza la idea de que la muerte neuronal obedecería a mecanismos excitotóxicos.

La prueba directa de que el MK801 disminuye el control inhibitorio gabaérgico proviene de un trabajo electrofisiológico en el que midieron la actividad eléctrica de las neuronas piramidales vulnerables de la RSC (121). Estos autores constataron, en

rebanadas de cerebro, que las corrientes inhibitorias mediadas por el receptor GABA-A disminuyeron en estas neuronas cuando se agregó MK801 (10-40 μM) al medio de cultivo. Es interesante señalar que esta disminución fue de menor magnitud en rebanadas de la corteza parietal, en la cual los α -NMDA no provocan muerte neuronal. Este hecho explicaría, en parte, la selectividad del efecto neurotóxico y refuerza la posible participación de los receptores GABA-A en el mecanismo tóxico del MK801.

De acuerdo con lo que antecede, los receptores GABA-A están modulados indirectamente por el MK801, pero no está dilucidado si esta acción neuroquímica conlleva a la muerte de las neuronas retrospleniales y/o de otras cortezas.

Participación de receptores glutamatergicos AMPA/KA

Los receptores AMPA y kainato están acoplados a canales iónicos permeables tanto al sodio como al potasio. Estudios de clonación han demostrado la existencia de por lo menos nueve subunidades capaces de formar receptores del glutamato activados selectivamente por AMPA y Kainato, los fármacos de los que derivan sus nombres. Debido a que estos receptores no son activados por el NMDA se los agrupa como receptores no-NMDA o AMPA/KA. Las subunidades contienen alrededor de mil residuos de aminoácidos y tienen una estructura básica compuesta por cuatro segmentos transmembranales. Cuatro de estas subunidades son preferencialmente activadas por AMPA, llamadas GLUR 1 a 4, y las otras cinco son activadas preferencialmente por kainato; tres de ellas se denominan GLUR 5 a 7 y las otras dos KA 1 y 2 (Figura 5).

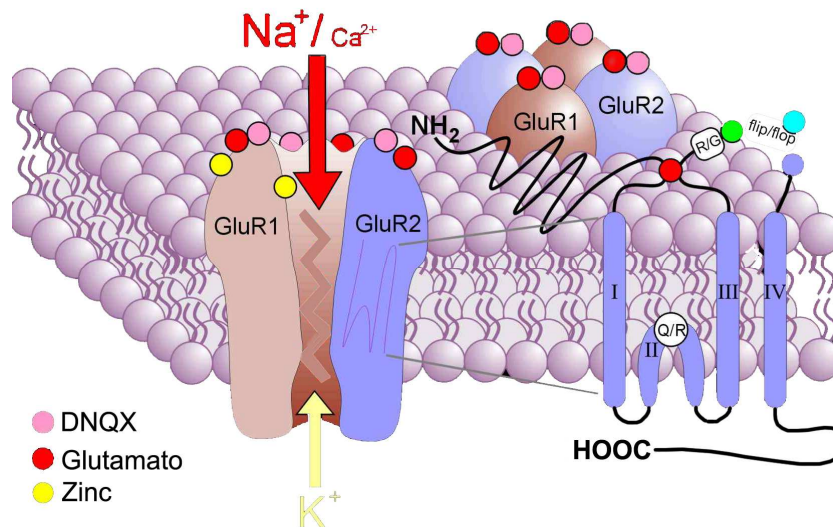


Fig. 5: Representación de un receptor AMPA. En la misma se observa la estructura tetramérica del receptor siendo cada subunidad formada por cuatro dominios transmembranales. Estos receptores forman canales que son mayormente permeables al sodio los cuales se abren cuando el glutamato se liga a sus sitios de unión. Asimismo se muestran los sitios de unión al zinc y al DNQX, un antagonista de los receptores AMPA/KA de la familia de la quinoxilandionas. Adaptado de <http://www.chrisparsons.de/Chris/ampa.htm>.

Ciertas conformaciones pueden dar lugar a receptores permeables al calcio, por ejemplo, un receptor formado sólo por subunidades GLUR2, y los compuestos por esa subunidad y cualquiera de las otras, presentan poca permeabilidad al calcio, mientras que los receptores que no contienen la subunidad GLUR2 son permeables al calcio (195).

Hasta la aparición de las quinoxalindionas, que son antagonistas selectivos de los receptores no-NMDA, la neuropatología experimental había demostrado claramente que los receptores NMDA eran los mediadores de la muerte neuronal inducida por glutamato (5, 158). Sin embargo, estas nuevas herramientas farmacológicas permitieron poner de manifiesto que los receptores AMPA/KA son también mediadores de muerte neuronal excitotóxica siendo su papel, en muchos casos, más preponderante que el del receptor NMDA. Tal es el caso de ciertos cuadros neurodegenerativos observables en modelos animales de isquemia, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica y trauma cerebral (12, 118, 119, 155).

Más recientemente, la bibliografía ha mostrado que son particularmente importantes aquellas conformaciones de receptores que al carecer de la subunidad GLUR2 son altamente permeables al calcio, el cual es considerado el principal mediador intracelular de la muerte neuronal excitotóxica (5, 160). Como dato interesante, los receptores AMPA/KA permeables al calcio son también permeables al zinc, el cual es co-liberado junto al glutamato en las sinapsis glutamatérgicas corticales (50, 166, 218). Existen trabajos que demuestran que la acumulación intracelular de este catión es tóxica, convirtiéndose en otro mecanismo mediante el cual la sobreactivación de receptores AMPA/KA conducen a la muerte neuronal (23, 191, 214).

Si el glutamato estuviera involucrado en el mecanismo tóxico del MK801, sus acciones excitotóxicas deberían ejercerse, en principio, a través de los receptores AMPA/KA, ya que los receptores NMDA se encontrarían bloqueados tras la administración sistémica del MK801. Existen evidencias de que el bloqueo de receptores AMPA/KA previene la aparición de indicadores de estrés celular inducidos por MK801 (69, 186). No obstante, no hay trabajos que demuestren que el bloqueo de los receptores AMPA/KA protege contra la muerte neuronal, menos aún, si la putativa protección ocurre en otras áreas además de la RSC.

En síntesis, la revisión bibliográfica sugiere que la hiperfunción de receptores glutamatérgicos AMPA/KA y dopaminérgicos tipo D2, y la hipofunción de receptores GABA-A intervienen en la neurodegeneración provocada por a-NMDA. Sin embargo, no existen evidencias directas de estas hipótesis. Además, los trabajos que se han realizado valoraron la neurotoxicidad con técnicas que demuestran signos de estrés celular reversibles; de manera que los mecanismos mediante los cuales el MK801 induce muerte neuronal son desconocidos. Más aún, los experimentos previos se concentraron

exclusivamente en la RSC, desconociéndose si los mecanismos degenerativos (postulados para esta estructura) serían generalizables a otras áreas como el PLCo.

De esta manera, se propuso investigar la participación de los receptores dopaminérgicos (D2 y D4), gabaérgicos (GABA-A) y glutamatérgicos (AMPA/KA, NMDA) en la muerte neuronal inducida por MK801 en roedores, profundizando en el curso temporal de su/s involucramiento/s y apelando a la administración *in situ* para discriminar efectos sistémicos de los que ocurrirían específicamente en la RSC. Complementariamente, se midieron los niveles de GABA y glutamato en homogenatos de corteza cerebral, se emplearon quelantes del zinc sináptico y se trabajó con animales transgénicos que carecen de receptores dopaminérgicos.

Hipótesis

En el presente trabajo de tesis se postula que la degeneración inducida por MK801 es ejercida indirectamente a través de un desbalance en la neurotransmisión que provoca un estado excitotóxico en ciertas poblaciones neuronales de la RSC. Tal estado excitotóxico es inducido específicamente por una hiperfunción de receptores AMPA/KA y D2 /D4, y la hipofunción de receptores GABA-A. Asimismo se postula que algunos de estos mecanismos también participan en la degeneración inducida por MK801 en el PLCo.

Objetivo general

El objetivo general del trabajo es contribuir a la comprensión de los mecanismos mediante los cuales drogas a-NMDA inducen muerte neuronal, evaluando con la mayor precisión posible el rol de ciertos receptores de membrana potencialmente involucrados en el mecanismo neurotóxico de este tipo de sustancias.

Objetivos específicos

- 1) Examinar si el efecto neurodegenerativo del MK801 esta mediado por receptores:
 - A- Dopaminérgicos D2 y D4
 - B- Gabaérgicos GABA-A
 - C- Glutamatérgicos AMPA/KA

- 2) Conocer el curso temporal de la participación de:
 - A- Receptores gabaérgicos GABA-A
 - B- Receptores glutamatérgicos AMPA/KA, AMPA/calcio y NMDA
 - C- Zinc sináptico

- 3) Analizar los niveles de glutamato y GABA durante la intoxicación con MK801.

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Ratas hembras adultas de cepa Wistar (N = 300) provenientes del bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (IMMF) y del Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC). El sexo femenino fue seleccionado debido a que es más sensible a los efectos neurotóxicos del MK801 (7, 46).

Para los experimentos de comparación entre especies se utilizaron también ratas machos de la cepa Wistar y ratones de ambos sexos de las cepas C57BL/6-129/Sv (N = 25) y CD-1 (N = 10) del bioterio del IMMF y ratones CF-1 (N = 10) provenientes del Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), Buenos Aires. Además, se utilizaron dos líneas de ratones “knockout” (KO), retrocruzadas por más de 8 generaciones con la cepa exogámica albina CF-1. Una fue KO del receptor D2 (-/-) y la otra KO del receptor D4 (-/-). Los animales KO (N = 20) fueron genotipificados al día posnatal 30 y se seleccionaron los homocigotos; consecuentemente, presentaban total ausencia de los receptores D2 o D4, según el caso. Los animales mutados y los controles normales (CF-1) fueron provistos por el Dr. Rubinstein en el INGENBI.

En todos los casos, los animales fueron mantenidos en grupos de seis bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h., a una temperatura controlada (20/22 °C) y con agua y comida *ad libitum*. El trato a los animales cumplió estrictamente con las exigencias éticas internacionales para animales de laboratorio (US National Institutes of Health -NIH- Publicación No. 85-23, revisada en 1996).

Drogas y tratamientos

Como prototipo de bloqueante NMDA se utilizó el MK801 (maleato de dizocilpina, dizocilpine maleate, (+) -5-Methyl -10, 11 -dihydro-5H-dibenzo [a,d] cyclohepten-5, 10-imine hydrogen maleate, RBI) cuya alta afinidad y especificidad lo convierten en el fármaco de elección en la investigación de los efectos inducidos por α -NMDA. La dizocilpina se suministró por vía intraperitoneal (i.p.) y la dosis fue de 2.5 mg/kg, adecuada para provocar una robusta degeneración en las áreas estudiadas sin alcanzar el efecto techo de la muerte neuronal (76), de manera tal que permite generar tanto disminuciones como aumentos en los niveles de neurodegeneración en función de los tratamientos empleados.

En todos los casos, pasadas 48 horas desde la administración i.p. de MK801 las ratas fueron sacrificadas para la obtención del material neurohistológico. Este tiempo de sobrevivencia ha sido seleccionado porque es el momento adecuado para detectar la muerte neuronal inducida por este fármaco (21, 89).

Fármacos co-administrados con el MK801 para modular los receptores en estudio

Para modular los receptores en estudio se administraron los siguientes fármacos, en dosis determinadas para cada caso en función de estudios piloto y trabajos previamente publicados.

-Haloperidol, antagonista de receptores dopaminérgicos, principalmente D2 (30, 78, 110). Las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados a las 0, 4 y 8 h. (3 inyecciones) con haloperidol en dosis de 10 mg/kg (grupo experimental) o ClNa 0,9 % i.p. (grupo control). Adicionalmente, otros dos grupos de animales recibieron respectivamente sólo solución salina o haloperidol (tres inyecciones cada 4 horas).

-Tiopental sódico, agonista de los receptores GABA-A (105, 123). Las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados a las 0, 4 y 8 h. (3 inyecciones) con tiopental sódico en dosis de 5 ó 10 mg/kg (grupos experimentales) o ClNa 0,9 % i.p. (grupo control). Además, otros animales controles fueron administrados sólo con 10 mg/kg de Tiopental (tres inyecciones cada 4 horas).

-Muscimol, agonista del receptor GABA-A de alta selectividad (67, 200). Las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados por vía intracerebroventricular (i.c.v.) a las 0 y 4 h. (2 microinyecciones) con muscimol en dosis de 0.4 µg o buffer fosfato salina (PBS) 0.01 M. Otros animales fueron administrados sólo con PBS o muscimol. Las administraciones i.c.v. se realizaron en animales no anestesiados en los que se había instalado previamente cánulas guías en el ventrículo lateral derecho. Las infusiones i.c.v. tuvieron un volumen final de 2 µL y fueron realizadas con jeringas Hamilton de 5 µL de capacidad. La inyección se realizó siempre en forma lenta y a velocidad constante en un periodo de 5 minutos y las cánulas inyectoras fueron dejadas 3 minutos más antes de ser retiradas, con el objetivo de que la droga difunda y evitar la presión negativa al retirarlas.

En otro set de experimentos, las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados *in situ* en la RSC (intra-RSC) con muscimol en dosis de 10, 100 ó 1000 ng o PBS 30 minutos después del MK801. Otros animales fueron administrados para control sólo con PBS o 1 µg de muscimol. Las administraciones intra-RSC siempre se efectuaron en animales libres de anestesia tras instalar previamente cánulas guías en el cerebro. El volumen de infusión fue de 0.5 µL administrado en un periodo de 5 minutos, empleando jeringas Hamilton de 1 µL. Las cánulas quedaron situadas en el sitio correspondiente 3 minutos tras el suministro de los fármacos, con el propósito de que la droga difunda y evitar la presión negativa al retirarlas.

Además, para evaluar el efecto de administraciones del agonista GABA-A tras iniciar la intoxicación con MK801, distintos grupos de ratas fueron inyectados con MK801

y co-administrados intra-RSC con muscimol en dosis de 100 ng o PBS a las 0.5, 5, 10 o 24 h después del MK801.

-Picrotoxina, antagonista no competitivo de los receptores GABA-A (201). Las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados intra-RSC con picrotoxina en dosis de 300 ó 1200 ng o PBS 30 minutos después del MK801. En otros animales se administró sólo picrotoxina intra-RSC en dosis de 1200 ng o por vía i.p. 5 mg/kg, para comparar los efectos sistémicos con los locales.

-DNQX (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione), antagonista competitivo de receptores AMPA/KA (186, 217). El vehículo del DNQX fue dimetil sulfóxido (DMSO), compuesto orgánico que disuelve la droga a las concentraciones requeridas. Las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados i.c.v. con DNQX en dosis de 15 µg o DMSO a las 0, 4 y 8 h. (3 microinyecciones). Otros animales recibieron solamente el vehículo o DNQX.

En otro set de experimentos, las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados intra-RSC con DNQX en dosis de 0.5, 5 o 10 µg o vehículo 30 minutos después del MK801. Otros animales controles fueron administrados solo con vehículo o 10 µg de DNQX.

Para evaluar el efecto de administraciones del antagonista AMPA/KA a diferentes tiempos de iniciada la intoxicación con MK801, distintos grupos de ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados intra-RSC con DNQX en dosis de 5 µg o DMSO a las 0.5, 5, 10 o 24 h después del MK801.

-NASPM (1-Naphthylacetyl spermine), antagonista de receptores AMPA/KA permeables al calcio (120, 155). Las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados intra-RSC con NASPM en dosis de 10 µg o PBS a las 0.5, 5, 10 o 24 h después del MK801.

-CaEDTA, (calcium ethylene-diamine tetraacetic acid) quelante del zinc que no atraviesa la membrana celular (23, 166, 191). Las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados intra-RSC con CaEDTA en dosis de 560 µg o PBS a las 0.5, 5, 10 o 24 h después del MK801.

-MK801, para evaluar la participación de receptores NMDA en la RSC, las ratas fueron inyectadas con MK801 y co-administrados intra-RSC con MK801 en dosis de 3 µg o PBS a las 0.5, 5, 10 o 24 h después del MK801 i.p..

-Ácido kaínico, agonista de los receptores AMPA/KA (siendo el agonismo más potente hacia el receptor con el mismo nombre) (69, 146). En animales previamente canulados se realizaron microinyecciones intra-RSC de 1 μ L conteniendo 2.5 o 5 nmoles de ácido kaínico (0.5 y 1 μ g, respectivamente).

-AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid), agonista de los receptores AMPA/KA (siendo el agonismo más potente hacia el receptor con el mismo nombre) (69, 77). En animales previamente canulados se realizaron microinyecciones intra-RSC de 1 μ L conteniendo 2.5 o 5 nmoles de AMPA (0.45 y 0.90 μ g, respectivamente).

Cirugía para la canulación intracerebral

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilazina (40 y 10 mg/kg i.p., respectivamente) y ubicadas en un aparato estereotáxico. Previo pelado craneal, se perforó la calota craneana con torno odontológico y allí se colocaron cánulas guías de acero inoxidable (22 G) en el ventrículo lateral derecho, en las coordenadas: AP -0.8 mm, VD -1.8 mm, LM $+1.5$ mm (168). Las cánulas se fijaron con acrílico dental y tornillos enroscados en el hueso craneal. Luego las ratas se reubicaron en sus cajas habituales por un lapso de 7 días, para permitir su recuperación. Para las microadministraciones se fabricaron cánulas inyectoras (30 G) que sobrepasaran el extremo por 2 mm, para evitar la succión desde la cánula guía al momento de inyectar las soluciones.

En las ratas canuladas a nivel de la corteza retrosplenial se colocaron cánulas guías en los dos hemisferios en las coordenadas: AP -6.0 mm, VD -0.3 mm, LM ± 1.6 (168). Las cánulas inyectoras sobrepasaban el extremo por 1.5 mm. Aunque la administración intra-RSC fue realizada en un sólo hemisferio, se practicaron canulaciones bilaterales porque la alta irrigación de esta zona sumada a la superficialidad necesaria de la cánula guía (para evitar daño traumático de la zona a evaluar), tornaban a las mismas proclives a obstruirse. Asimismo, dado que la neurodegeneración se comparó entre el lado ipsi vs el contralateral a la inyección (ver valoración de la muerte neuronal) el hemisferio no inyectado es un mejor control cuando también está canulado (Figura 6).

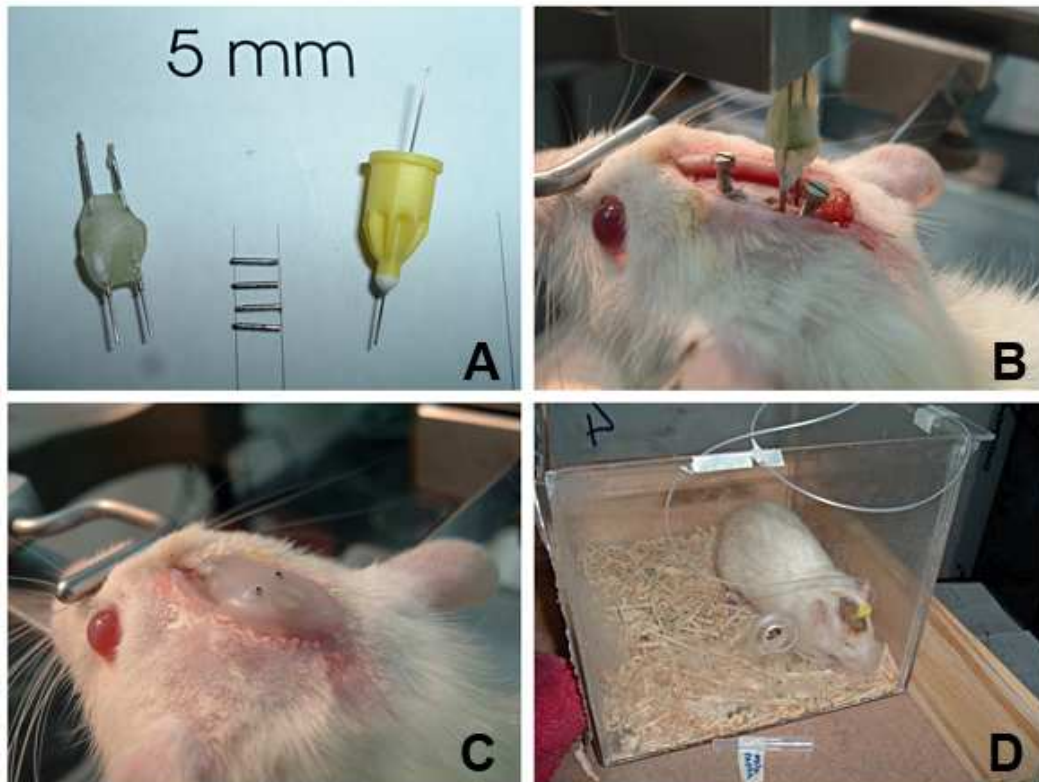


Fig. 6: Fotografías que muestran parte del proceso de canulación de la corteza retrosplenial. En **A**, la plataforma (izq.) para la instalación de las cánulas guía (al medio) que luego permitirán la inserción de la cánula inyectora (derecha). En **B** y **C** un animal anestesiado en el aparato estereotáxico durante las fases finales de la doble canulación intra-RSC. En **D** un animal 7 días después de la operación, libre de anestesia, que esta siendo administrado con vehículo, a través de un catéter que conecta la cánula inyectora con la jeringa Hamilton.

Administración de MK801 en ratones

Ratones KOD2, KOD4 y sus controles normales (CF-1) fueron administrados con una única dosis de MK801 de 10 mg/kg i.p. o salina 0.9 %. Luego de 72 horas fueron perfundidos transcardíacamente para la obtención del material neurohistológico. El tiempo de sobrevivencia y la dosis fueron seleccionados basados en trabajos previos en ratas y ratones (21, 211).

En experimentos destinados a comparar entre ratones y ratas la degeneración inducida por MK801, animales de ambas especies fueron tratadas con una dosis i.p. de 10 mg/kg de MK801 o NaCl 0.9%. Debido a que previamente se demostró que la muerte neuronal en ratas es máxima entre las 48-72 h. (21), estas fueron sacrificadas 72 h. post inyección. Para obtener el tiempo en que ocurre el máximo nivel de neurodegeneración en los ratones, diferentes grupos fueron sacrificados a las 15, 24, 32, 48, 56 o 72 h. post inyección. Para evaluar los efectos de tratamientos subcrónicos en ratones, distintos

grupos de animales fueron administrados con dos dosis de 10 mg/kg de MK801 separadas por 4 h. (dosis final de 20 mg/kg) ó una primera dosis de 20 mg/kg seguida de 2 inyecciones de 10 mg/kg c/u separadas por 4 h (dosis final de 40 mg/kg). Estos animales fueron sacrificados 24 h. después de la última inyección

Obtención del material histológico

En animales anestesiados con hidrato de cloral se canuló la aorta ascendente con una sonda conectada a una bomba peristáltica. Por esa vía se infundieron 150 mL de solución lavadora en ratas y 50 mL en ratones, para eliminar la sangre del sistema vascular que irriga al cerebro. Seguidamente, a fin de conservar los cerebros para las técnicas histológicas se introdujeron 300 mL de solución fijadora en las ratas y 150 mL en ratones.

Solución lavadora

Glucosa 0.4 %

Sucrosa 0.8 %,

Cloruro de sodio 0.8 %

Solución fijadora (pH 7.5)

paraformaldehído 4 %;

di-sodio tetra-borato 0.38 %;

sulfito de sodio 0,004 %;

ácido bórico 1 %

Posteriormente, se dejaron los cerebros en su caja craneal a 4 °C por 24 h. para luego ser extraídos y colocados en sucrosa al 30 % para crioprotección. A continuación, los cerebros se seccionaron en plano coronal con micrótopo de congelación a 40 µm de espesor y las secciones fueron colectadas seriadamente en solución fijadora o PBS 0.01 M, según la técnica que se aplicó a posteriori.

Técnicas histopatológicas para la detección de la neurodegeneración

1) Amino-Cupro-Argéntica (A-Cu-Ag): este procedimiento histoquímico es específico para la detección de neurodegeneración (44) y es ampliamente utilizado en neuropatología y neurotoxicología experimental (193). Además han mostrado ser más

efectivas que otras técnicas en la detección de los efectos neuropatológicos del MK801 (73). Las etapas de la técnica se ejecutaron tal como figuran en su publicación. Brevemente, el procedimiento comenzó con la preparación de la solución preimpregnadora compuesta de:

Agua bidestilada	100 mL
Nitrato de Plata	100 mg
Acido α -amino-n-butírico	53 mg
DL-Alanina	46 mg
Nitrato de Cobre 0,5%	2 mL
Nitrato de Cadmio 0,5%	0,2 mL
Nitrato de Lantano 0,5%	1,5 mL
Rojo Neutro 0,5%	0,5 mL
Piridina	1 mL
Trietanolamina	1 mL
Isopropanol	2 mL

Una vez preparada, la solución preimpregnadora se calentó hasta alcanzar los 50 °C en un horno microondas (Menumaster FS-14 EVP) y luego se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, los cortes a teñir se lavaron con agua deionizada y fueron pasados a la solución preimpregnadora filtrada donde se calentaron en el horno microondas hasta alcanzar los 50 °C. Después que la mezcla permaneció a temperatura ambiente (2 horas aproximadamente) los cortes fueron sometidos a un lavado con agua deionizada y dos lavados con acetona pura, llevando cada lavado un tiempo de 45 segundos. Luego los cortes se trasladaron a la solución impregnadora en agitación constante durante 55 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se compone de:

Nitrato de plata	412 mg
Agua bidestilada	5 mL
Etanol 100%	4 mL
Acetona	0,05 mL
Hidróxido de litio 0,4%	3 mL
Amoníaco	0,65 mL

Estos cortes fueron luego traspasados directamente a una solución reductora que estaba a 32 °C durante 25 minutos bajo agitación constante y agregándole cada 5

minutos un volumen de 0,3 mL de la misma solución impregnadora que se ha utilizado anteriormente.

Agua bidestilada	800 mL
Formalina 10%	11 mL
Etanol 100%	90 mL
Acido Cítrico 1%	6,5 mL

Después los cortes se sometieron a lavados con agua deionizada. Para la subsiguiente decoloración, los cortes fueron sumergidos en una solución de ferrocianuro de potasio 0,4 % (1-3 minutos) y en otra de permanganato de potasio 0,06 % (15-45 segundos), intercalando éstos con lavados de agua destilada. Finalmente los cortes fueron pasados por preparaciones estabilizadoras de tiosulfato de sodio 2 % y agua deionizada, tras lo cual se montaron en portaobjetos y fueron cubiertos con medio de montaje (Permound o DPX).

Como la técnica A-Cu-Ag ha sido desarrollada sobre la base del tejido de cerebros de rata, fue necesario un periodo de “puesta a punto” para su aplicación al tejido de ratón ya que, en principio, los cortes murinos ofrecían mucha tinción inespecífica que dificultaban el análisis histopatológico. La modificación (desarrollada empíricamente) que permitió aplicar esta técnica con éxito sistemático en el tejido cerebral de ratón consistió en que, previo a la preimpregnación, los cortes seleccionados para la tinción fueron sometidos a un lavado en etanol al 40 %, en agitación suave durante treinta minutos. Después se los lavó con agua bidestilada durante 1 minuto y los cortes se colocaron en la solución preimpregnadora a partir de lo cual se prosiguió con el protocolo tal como se describió arriba.

2) Fluoro-Jade B (FJ-B): marcador fluorescente selectivo de neuronas en estado degenerativo (181). Los pasos de la técnica se realizaron siguiendo las recomendaciones de sus autores. Brevemente, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados y una vez deshidratados se cumplieron los siguientes pasos a través del pasaje de los portaobjetos en recipientes conteniendo las siguientes soluciones:

- 5 min. en xileno
- 2 min. en alcohol 100 %
- 2 min. en alcohol 50 %
- 2 min. en agua destilada
- 10 min. en permanganato de potasio 0,06 %
- 2 min. en agua destilada

- 20 min. en Fluoro-Jade B 0,0004 % en ácido acético 0,1 %
- 1 min. en agua destilada
- 1 min. en agua destilada
- 1 min. en agua destilada
- 60 min. secado en la plancha a 50 °C
- 1 min. (al menos) en xileno
- Colocación de cubreobjeto con DPX.

Valoración de la muerte neuronal

En los experimentos en que el fármaco co-administrado con MK801 fue inyectado por vía i.p. o i.c.v., el número de neuronas degeneradas fueron cuantificadas en la RSC y el PLCo. El conteo fue realizado en hemisecciones en los niveles -respecto al bregma, según el atlas del cerebro de la rata (168)- en donde la muerte inducida por MK801 es máxima y sistemática (-6.7 mm para la RSC y -2.7 mm para el PLCo; Figura 7). Los valores de cada caso surgen del promedio de tres cortes (para cada técnica histológica) próximos al punto de referencia antedicho.

En los ratones, el conteo de neuronas argirofílicas fue realizado en hemisecciones de la RSC en los niveles -respecto al bregma, según el atlas del cerebro del ratón (169)- en donde la muerte inducida por MK801 es máxima y sistemática (-3.1/-3.5 mm). Los valores de cada caso surgen del promedio de tres cortes próximos al punto de referencia antedicho.

En los experimentos con administraciones intra-RSC se cuantificaron las neuronas en tres cortes tanto en el lado ipsi como el contralateral a la inyección. Estos conteos se realizaron en dos niveles, uno próximo a la inyección (aprox. 0.7 mm) y en otro alejado de la misma (aprox. 3.5 mm). Los tres valores de cada hemisferio se promediaron y se calcularon los cocientes entre el lado ipsilateral a la inyección vs el contralateral en los dos niveles -cerca y lejos de la inyección- (Figura 8). De esta manera, los controles están constituidos por el hemisferio adyacente no inyectado, por las mediciones en el sitio alejado de la inyección y por los animales microinyectados con vehículo en los que se realizaron los mismos conteos.

En todos los casos, el registro fue realizado directamente desde el microscopio a un aumento de 40x de manera ciega a la condición.

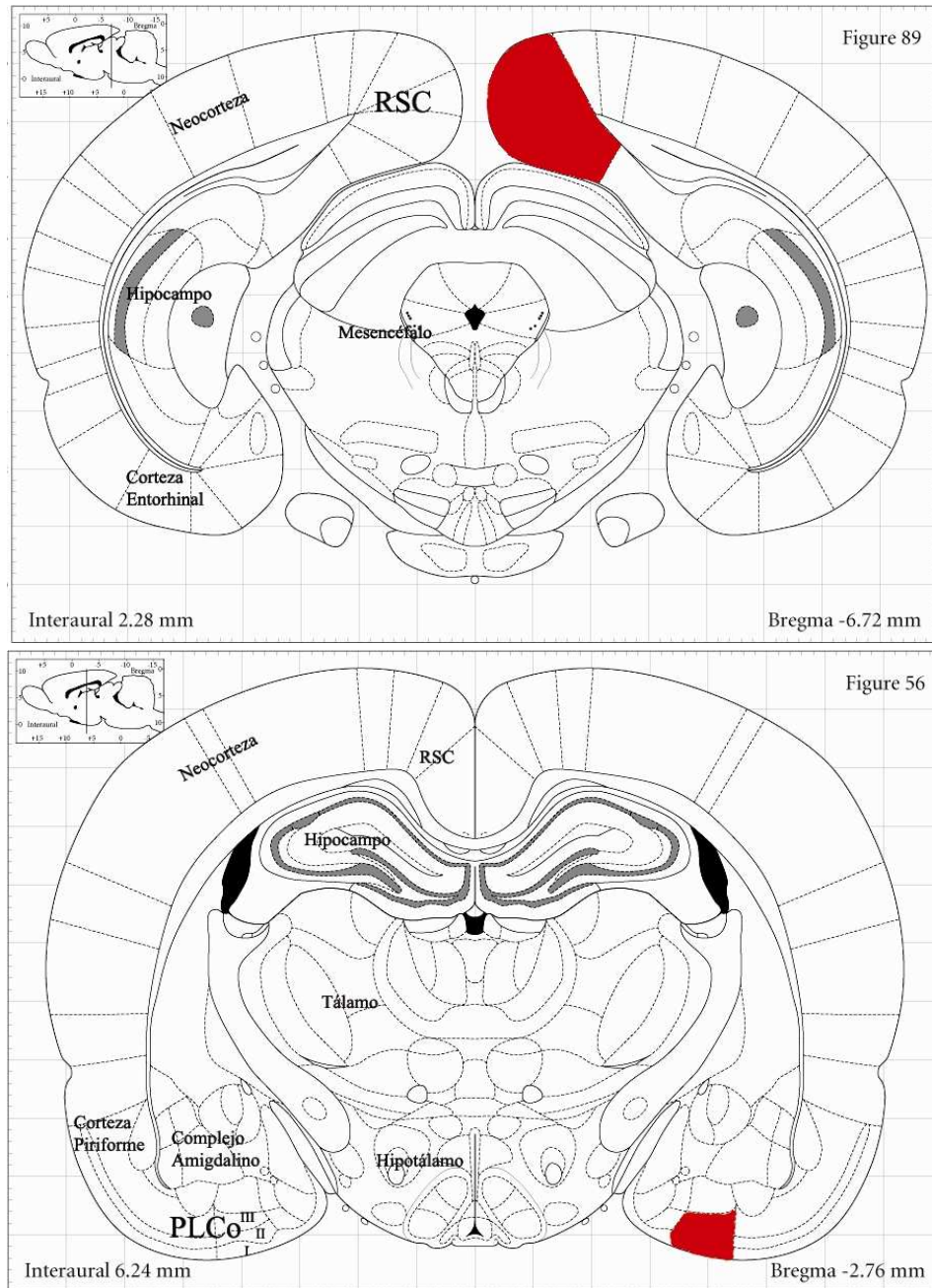


Fig. 7: Arriba, la representación del atlas de la rata donde se muestra el corte coronal de referencia utilizado para la cuantificación de la muerte neuronal en la corteza retrosplenial (RSC). Abajo, el corte utilizado para los conteos realizados en el núcleo amigdalino cortical posterolateral (PLCo). Las áreas son bilaterales y están pintadas en rojo en un solo hemisferio. Modificado de Paxinos y Watson, 2007.

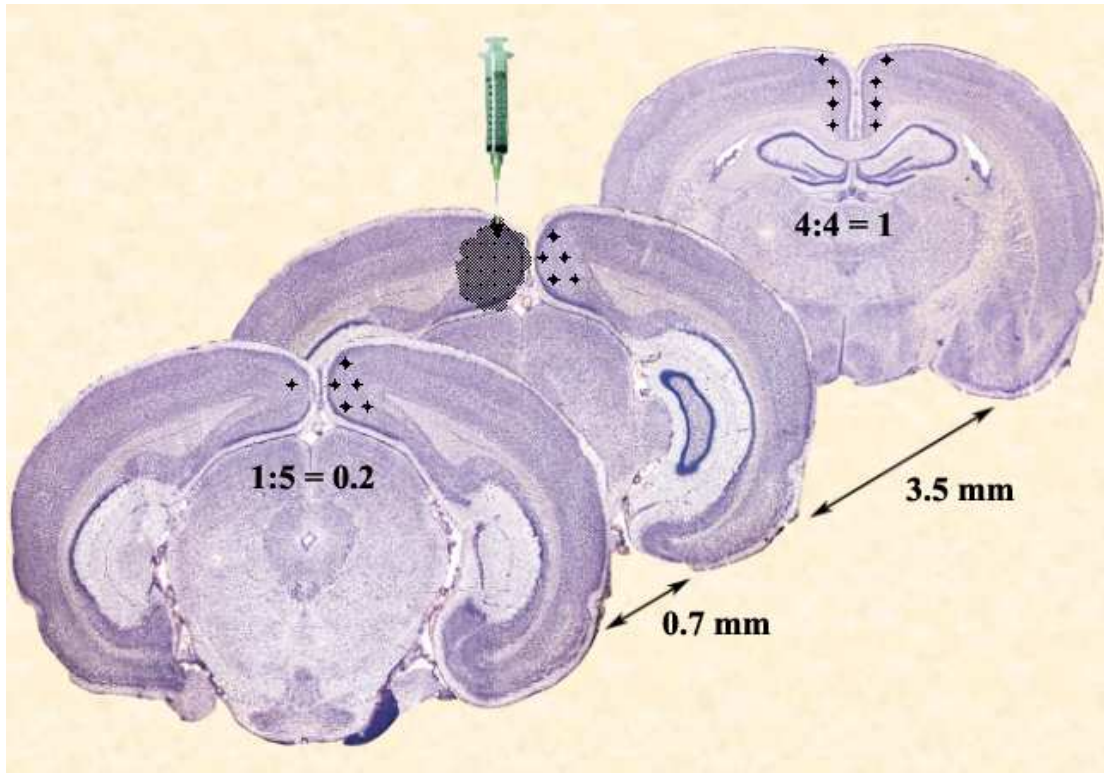


Fig. 8: Representación de la administración de un fármaco administrado en la RSC (Bregma -6.00 mm) que confiere protección en el área próxima al sitio de la inyección en el hemisferio ipsilateral. El cociente entre el lado inyectado vs. el contralateral en el sitio alejado (3.5 mm) es 1 indicando que no hubo efectos de la droga. En cambio, el cociente próximo a la inyección (0.7 mm) es 0.2 indicando (expresándolo en porcentaje) que hubo un 20 % de muerte respecto de lado control o, lo que es lo mismo, un 80% de protección asociada a la inyección. Nota: el tamaño de las neuronas y la cantidad están fuera de escala.

Doble tinción: técnica A-Cu-Ag y técnica de Nissl

Para identificar fehacientemente la localización laminar de las neuronas argirofílicas se seleccionaron preparados procesados con la técnica A-Cu-Ag que fueron sometidos a la tinción de Nissl, la cual colorea los somas neuronales permitiendo delimitar las distintas capas de la corteza.

Solución colorante

Rojo neutro	0,5 g
Agua destilada	100 mL

Procedimiento:

- Serie de alcoholes de hidratación
- Incubación en solución de rojo neutro durante 2 minutos
- Lavados con agua destilada

Serie de alcoholes para la deshidratación
Incubación en xileno (dos veces)
Colocación de cubreobjeto con DPX

Doble tinción: FJ-B y HOECHST

Para identificar fehacientemente la localización laminar de las neuronas fluoro jade positivas se seleccionaron preparados que fueron procesados conjuntamente con la tinción de FJ-B y HOECHST, la cual colorea los somas neuronales permitiendo delimitar las distintas capas de la corteza. Para realizarlo se siguieron los mismos pasos descriptos para la técnica de FJ-B excepto que en la solución de fluoro jade se agregó el colorante HOECHST quedando en una concentración de 0,005 %.

Medición de Glutamato y GABA en homogenatos

Ratas hembras adultas de cepa Wistar del IMMF fueron cicladas y sólo se utilizaron aquellas que estaban en diestro, etapa del ciclo en que las hormonas femeninas son estables, para evitar variabilidad en la medición de los neurotransmisores. Las mismas recibieron una infección de salina (0.9 % 0.5 ml i.p.) o MK801 (2.5 mg/kg i.p) y fueron sacrificadas por decapitación (sin anestesia) 8 ó 24 horas después. Estos tiempos coinciden con el inicio de la muerte neuronal y la fase previa al efecto techo en la expresión de la misma, respectivamente.

Los cerebros fueron extraídos en el menor tiempo posible e inmediatamente después se seccionaron los bulbos olfatorios, una porción de la corteza olfatoria (que principalmente incluía una parte de la corteza piriforme, la corteza entorhinal y el PLCo) y la RSC. Con el auxilio de un molde grillado estándar de cerebro de rata se realizó un corte coronal 5 mm delante del bregma, para obtener los bulbos olfatorios, y entre 2.5 y 7.5 mm detrás del bregma, para extraer la porción caudal del cerebro. Bajo microscopio, la RSC fue extraída de la porción caudal del cerebro siguiendo los lineamientos de una publicación previa (220). La corteza olfatoria fue obtenida de cada hemisferio (de la porción caudal) realizando un corte horizontal a la altura de la fisura rhinal y luego separando el diencefalo, el mesencefalo y el hipocampo ventral. Cada área fue colocada en un ependorf, pesada en una balanza de alta precisión y conservada en freezer a -70 °C hasta el momento de las determinaciones.

El Glutamato y el GABA se cuantificaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Waters 1515, Isocratic HPLC Pump) acoplada a un detector electroquímico

(Waters 2465). Los datos fueron obtenidos y procesados por medio del programa Empower Pro (Waters Corporation, 2002). Se utilizó una columna ODS (150 mm x 4,6 mm, Symmetry; Waters corp). Las estructuras cerebrales se homogeneizaron mecánicamente con ácido perclórico (APC) 0,1 M en una relación de 10 µL del ácido por cada miligramo de tejido. Se centrifugó a 30000 g durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, a 65 µL del sobrenadante se le adicionaron secuencialmente y siempre en el mismo orden, 50 µL de buffer borato 0,1 M, pH 10,4, 13 µL de una solución de 2-mercaptoetanol 0,1 % v/v en metanol calidad HPLC, y 2,5 µL de una solución de ftaldehído 0,1 % en metanol calidad HPLC. Se homogenizó y se incubó durante 10 minutos y, finalmente, 50 µL de la solución derivatizada fueron inyectados en el sistema de HPLC. La fase móvil consistió en una solución de ácido acético glacial (grado HPLC) 0,5 M, 0,05 mM de EDTA, 2 mM de NaCl, acetonitrilo al 12 % y metanol al 5 %, llevado a pH 3,5 con ácido fosfórico. El potencial del electrodo de referencia fue fijado a 1000 mV contra un electrodo de trabajo de carbón vítreo. La sensibilidad del detector electroquímico se ajustó a 50 nA. La columna y el detector fueron termostatzados a 45 °C. El flujo de la fase móvil fue de 1,6 mL/min desde el inicio de la corrida hasta los primeros 12 min. Luego fue cambiado a 2,5 mL/min, flujo que se conservó hasta el final de la corrida, que duró 40 minutos.

Estadística

Para analizar los datos obtenidos en los experimentos en que se administraron los fármacos por vía sistémica o i.c.v. se utilizó ANOVA de dos vías (tratamiento x estructura) y cuando este indicó diferencias significativas, se realizaron pruebas post hoc de Fisher. Los animales tratados solamente con solución salina o el fármaco modulador del receptor estudiado (haloperidol, tiopental, muscimol y DNQX) no fueron incluidos en el análisis por no presentar ningún signo de neurodegeneración. Para el análisis de los experimentos en que el fármaco modulador fue administrado intra-RSC se utilizó ANOVA de dos vías (dosis x distancia de la inyección). Existiendo dos medidas dentro del mismo sujeto (distancia de la inyección: cerca vs. lejos) esta variable fue incluida como factor intrasujeto (within). Cuando el ANOVA indicó diferencias, se realizaron análisis post hoc de Fisher.

Para la comparación entre ratones normales y KO se realizó un ANOVA de una vía (genotipos) y cuando este indicó diferencias, se realizaron análisis post hoc de Fisher. Los animales tratados con salina no fueron incluidos en el análisis por no presentar ningún signo de neurodegeneración. Las comparaciones entre ratas y ratones de distintos sexos se realizaron mediante ANOVA de dos vías (especie x sexo) y cuando este indicó diferencias, se realizaron análisis post hoc de Fisher. Los animales tratados solamente

con salina no fueron incluidos en el análisis por no presentar ningún signo de neurodegeneración.

Finalmente, el análisis de las diferencias entre neurotransmisores se realizó mediante ANOVA de una vía y cuando este indicó diferencias, se realizaron análisis post hoc de Fisher. Los animales inyectados con salina (sacrificados a las 8 y 24 h.) se unificaron como un solo grupo control.

Cada grupo (experimentales y controles) de los experimentos desarrollados estuvieron conformados por 4-7 animales. En todos los casos el criterio para la significación estadística fue una probabilidad de error de tipo I menor a 5 % ($p < 0.05$).

Capítulo 3
RESULTADOS

Participación de receptores dopaminérgicos en la muerte neuronal inducida por MK801

La administración sistémica de haloperidol previene la degeneración en el PLCo pero no en la RSC

Para comenzar a indagar si los receptores dopaminérgicos están involucrados en el mecanismo degenerativo del MK801 se utilizó haloperidol, un antagonista de los receptores dopaminérgicos, preferencialmente de tipo D2. Ratas hembras fueron administradas con una dosis de 2.5 mg/kg de MK801 (dosis neurodegenerativa submáxima) y coadministradas con salina o 10 mg/kg de haloperidol por vía i.p. y sus cerebros fueron procesados 48 h. después para evaluar la neurodegeneración. Para garantizar que la biodisponibilidad del haloperidol fuese paralela a la intoxicación con MK801 el haloperidol se aplicó a las 0, 4 y 8 horas después del MK801.

Los animales administrados únicamente con salina o con haloperidol, no mostraron ningún signo de neurodegeneración por lo que no fueron incluidos en el posterior análisis estadístico. Las ratas tratadas con MK801 y salina mostraron consistentemente muerte neuronal en la RSC y en el PLCo. La degeneración en la RSC afectó específicamente a neuronas de las capas IV y Va, cuyas prolongaciones degeneradas se extendían en esas capas y en la capa I, respetando claramente las capas II y III donde sólo se observaron proyecciones de pasaje. En el PLCo los somas neuronales degenerados se localizaron en las capas II y III y sus prolongaciones degeneradas se extendían en toda la estructura. La especificidad anatómica y laminar de la neurodegeneración inducida por MK801 coincide con los reportes previos que analizaron la distribución de la neurodegeneración inducida por MK801 y otros a-NMDA (21, 58, 74, 89) y fue sistemáticamente replicada en todos los grupos controles tratados con MK801 de los subsiguientes experimentos.

En las ratas que recibieron MK801 y haloperidol la degeneración somatodendrítica fue marcadamente menor en el PLCo presentando una disminución del 92 ± 5 % respecto del control. En contraste, en la RSC hubo una tendencia (no significativa) a aumentar la muerte neuronal (Figura 9) [ANOVA de dos vías: estructura cerebral ($F_{1,14} = 12.40$ $p < 0.01$) tratamiento ($F_{1,14} = 0.28$ $p < 0.6$) y tratamiento x estructura ($F_{1,14} = 12.44$ $p < 0.01$); seguido del post hoc LSD Fisher: Haloperidol vs salina en PLCo ($p < 0.05$)]. Los datos sugieren que la activación de receptores dopaminérgicos participa en la neurotoxicidad inducida por MK801 en el PLCo mientras que estos receptores no estarían involucrados en la degeneración de la RSC. Esto implicaría que diferentes mecanismos neurotóxicos operan en las estructuras vulnerables al MK801.

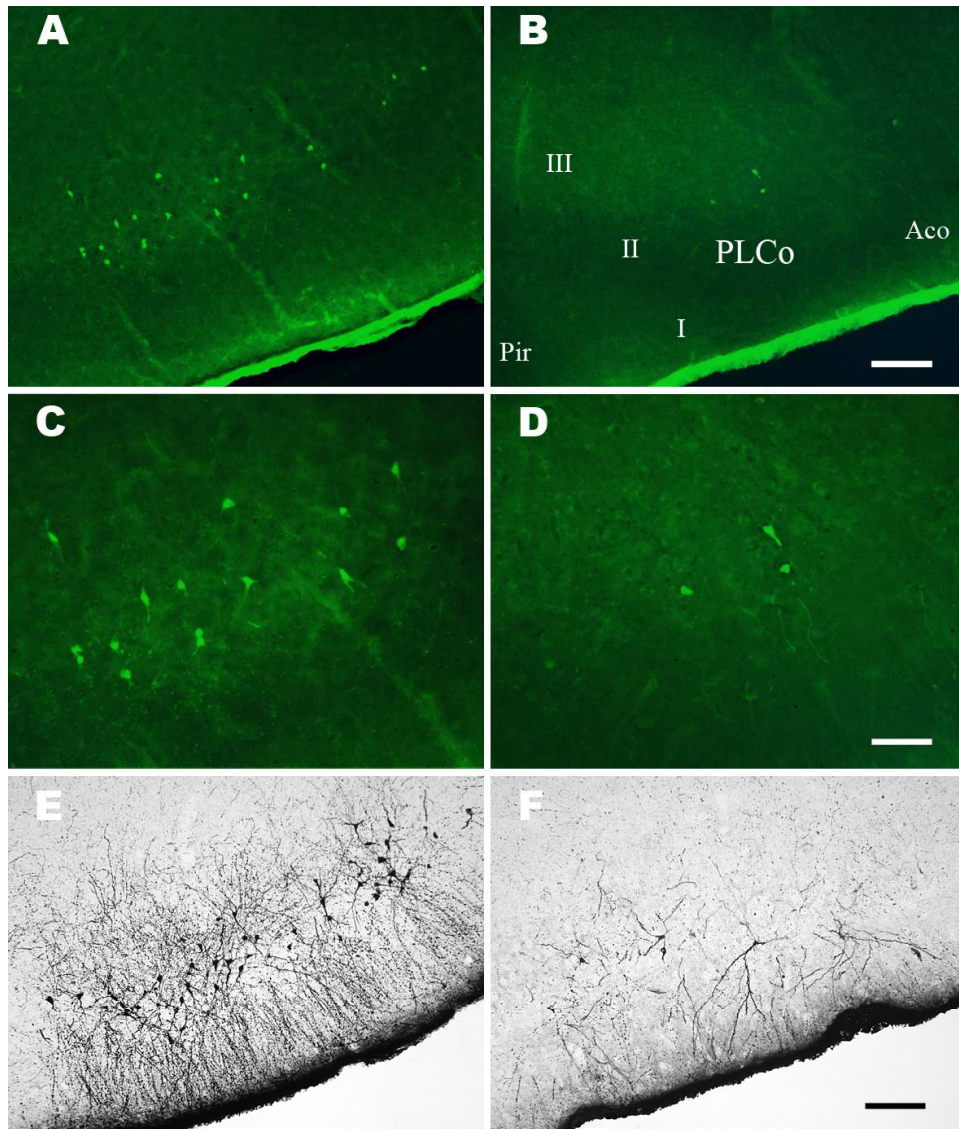


Fig. 9: Efecto protector del haloperidol en el PLCo ante la neurodegeneración inducida por MK801. Cortes coronales del núcleo amigdalino cortical posterolateral (PLCo) de ratas que recibieron MK801 (2.5 mg/kg i.p.) y salina o haloperidol (10 mg/kg i.p. cada 4 h. x3) que fueron analizados con las técnicas FJ-B (A-D) y A-Cu-Ag (E-F). En A, C y E observamos el patrón de muerte neuronal en PLCo característico de animales tratados con MK801 y salina. En B, D y F, una rata tratada con MK801 y haloperidol que presentó un marcado efecto protector. Escala de la barra 100 μ m (objetivo 10x) en B y F, 200 μ m en D. En G la cuantificación de la muerte neuronal ($M \pm EE$ en %) en el PLCo y la corteza retrosplenial (RSC). * $p < 0.05$, respecto del control: salina + MK801, Aco: núcleo amigdalino cortical anterior, Pir: corteza piriforme.

Animales carentes de receptores D2 y D4 no difieren de controles en la degeneración neuronal inducida por MK801 en la RSC

Para evaluar la participación de los receptores dopaminérgicos D2 y D4 en el mecanismo tóxico del MK801 se emplearon dos líneas de ratones que carecen de receptores D2 (112) y D4 (177). Estas cepas de animales proveyeron una oportunidad para enmendar la falta de selectividad de los antagonistas dopaminérgicos ya que las deleciones genéticas son 100 % selectivas (171).

Ratones normales (en los cuales sí se expresan receptores D2 y D4) y KOD2 y KOD4 fueron administrados con MK801 y la neurotoxicidad analizada 72 h. después. Las comparaciones de la neurodegeneración en la RSC entre las distintas cepas no arrojaron diferencias (Figura 10) (ANOVA de una vía $F_{1,26} = 1.03$ $p > 0.37$), confirmando que dichos receptores no son relevantes en los efectos degenerativos del MK801 en esa estructura. Inesperadamente, ninguna de las cepas de ratones (incluido el grupo control, sin alteraciones genéticas) mostraron signos de neurodegeneración en el PLCo (Figura 11) por lo que este experimento no permitió evaluar la participación de los receptores dopaminérgicos en esta estructura.

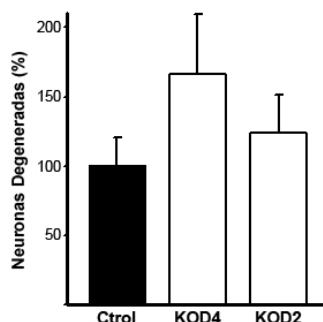


Fig. 10: Ratones carentes en receptores D2 y D4 no difieren de controles en la muerte neuronal inducida por MK801 en la RSC. El grafico muestra la cuantificación de la muerte neuronal en la corteza retrosplenial (RSC) de ratones de tres genotipos: normales (Ctrl), carentes en receptores D2 (KOD2) y carentes en receptores D4 (KOD4) que fueron administrados i.p. con 10 mg/kg de MK801. Los valores están expresados en % respecto del control y reflejan la $M \pm EE$ correspondiente. No hubo diferencias significativas entre los genotipos.

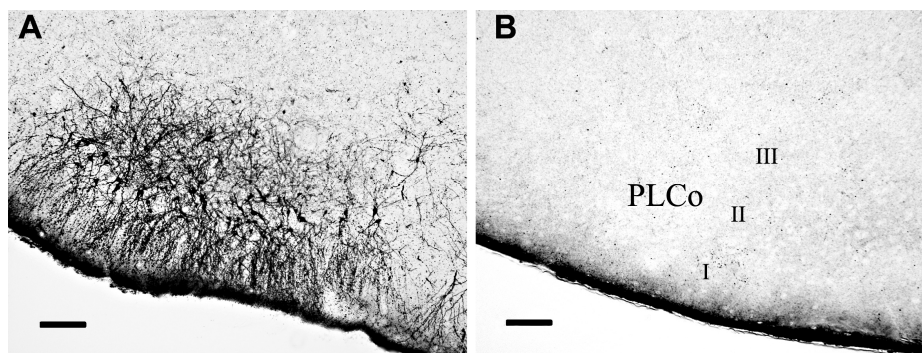


Fig. 11: Diferencias en la sensibilidad de las neuronas del PLCo a la neurotoxicidad del MK801 entre ratas y ratones. Cortes coronales del núcleo amigdalino cortical posterolateral (PLCo) de una rata (A) y un ratón (B) que fueron administrados con MK801 (10 mg/kg i.p.) y teñidos con la técnica A-Cu-Ag para la detección de neurodegeneración. Nótese la total ausencia de signos degenerativos en esta estructura en el ratón que contrasta con la robusta muerte neuronal en la rata. Escala de la barra 100 μ m en A y 50 μ m en B.

Comparación entre ratas y ratones en la neurodegeneración inducida por MK801

La imprevista ausencia de neurodegeneración inducida por MK801 en los ratones en áreas que en las ratas muestran profusa muerte neuronal, instó a realizar un análisis sistemático utilizando otras cepas de ratones normales. La cepa CD-1 fue seleccionada porque ha mostrado previamente ser sensible a los efectos neurotóxicos reversibles inducidos por α -NMDA (20) y la cepa C57BL/6-129/Sv para tener otro genotipo distinto permitiendo evaluar si los resultados obtenidos con la cepa CF-1 eran generalizables a otras cepas. El experimento inicial consistió en administrar salina o 10 mg/kg de MK801 a ratas y ratones de ambos sexos que fueron sacrificados 72 horas después para valorar la neurodegeneración.

Los animales tratados con salina no mostraron ninguna tinción indicativa de neurodegeneración, excepto en los bulbos olfatorios de ratones donde sistemáticamente se observó un nivel basal de neuronas de morfología apoptótica en la capa granular y periglomerular. Este resultado es coincidente con observaciones de otros autores que han utilizado técnicas para tinción de células apoptóticas (47).

Los ratones tratados con MK801 mostraron muerte neuronal en la RSC, bulbo olfatorio principal (MOB) y degeneración terminal en la capa lacunosum molecular del área CA1 del hipocampo. En determinados casos también se detectaron algunas neuronas degenerativas en la corteza entorhinal. En contraste, las ratas hembras tratadas con 10 mg/kg mostraron neurodegeneración de mucha mayor magnitud en esas mismas áreas y además profusa muerte somatodendrítica en el PLCo, giro dentado, corteza piriforme y sistemática degeneración terminal en áreas neocorticales. Otra diferencia importante fue que mientras en las ratas el efecto neuropatológico fue sexualmente dimórfico (siendo las hembras más sensibles que los machos) los patrones de neurodegeneración entre ratones de ambos sexos eran idénticos, indicando ausencia de diferencias sexuales (Tabla 1).

El análisis cuantitativo reveló que en ratas hembras los somas argirofílicos degenerados en la RSC promediaron los 233 ± 38 (por hemisección) y en machos 22 ± 5 mientras que en las cepas de ratones CD-1 fue de $4,4 \pm 1$ en las hembras y de $5,2 \pm 1$ en los machos. En las cepas C57BL/6-129/Sv y CF-1 los promedios fueron de 8 ± 1 y 3 ± 1 , respectivamente (Figura 12) [ANOVA de dos vías: especie ($F_{1,15} = 19.61$, $p < 0.01$), sexo ($F_{1,15} = 14.27$, $p < 0.01$) y especie x sexo ($F_{1,15} = 14.53$, $p < 0.01$); seguido del post hoc LSD Fisher: ratas hembras vs ratas machos y todos los ratones ($p < 0.0001$); ratas macho vs todos los ratones ($p < 0.001$)]. Así, el análisis cuantitativo confirmó que los ratones carecen del dimorfismo sexual y que la degeneración es de mucha menor magnitud.

Para determinar si la falta de degeneración en ciertas estructuras de los ratones pudiera deberse a que el tiempo de sacrificio no fuese el adecuado para esta especie, se

Tabla 1. Comparación de los efectos neurodegenerativos del MK801 entre ratas y ratones de ambos sexos

Estructura Cerebral	RATAS		RATONES	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Bulbo Olfatorio	SS	SS	S	S
Núcleo Olfatorio Anterior	T	-	-	-
Corteza Olfatoria Primaria	SSSTTT	-	-	-
Tubérculo Olfatorio	TT	-	-	-
Tenia Tecta	S	-	-	-
Amígdala Olfatoria	SSSTT	ST	-	-
Corteza Entorhinal	SSSTT	ST	s	s
Cuerno de Amon 1	TTT	TT	TT	TT
Giro Dentado	SSST	-	-	-
Subiculum	TT	T	-	-
Corteza Cingular Anterior	STTt	T	-	-
Corteza Retrosplenial	SSSSTTTT	STt	st	st
Corteza Sensorial	SSTTT	TT	-	-
Corteza Motora	T	T	-	-

La técnica A-Cu-Ag detectó degeneración somática (S) y terminal (T). El número de letras refleja el grado de severidad (1-4). Las letras minúsculas (s, t) indican grados intermedios.

realizó un estudio del curso temporal de la degeneración inducida por MK801 sacrificando distintos grupos a las 15, 24, 32, 48, 56 o 72 horas después de la administración. Dicho estudio replicó los hallazgos previos de que las únicas estructuras afectadas consistentemente en los ratones son la RSC, CA1 del hipocampo y el MOB, el cual presentó mayor cantidad de células apoptóticas a las 15 horas post-administración. La RSC no mostró diferencias cuantitativas entre las distintas sobrevividas estudiadas pero si se constató que a partir de las 48 horas las neuronas mostraban mayor fragmentación que en las ratas, sugiriendo que el proceso degenerativo o fagocítico es más rápido en los ratones.

Otros grupos de ratones fueron tratados con dosis repetidas de dos o tres inyecciones de MK801 (20 y 40 mg/kg finales) para verificar si otras estructuras pudieran mostrar cambios degenerativos al aumentar la dosis. A pesar de que dichos tratamientos generaron un aumento del número de neuronas en la RSC, la inspección del resto del cerebro no reveló que nuevas áreas presentaran cambios degenerativos, indicando que las únicas estructuras sistemáticamente injuriadas en los ratones son la RSC, el MOB y CA1, y que este patrón es similar en ambos sexos.

Para mayores detalles de este estudio derivado del experimento con ratones transgénicos remitirse al material anexo.

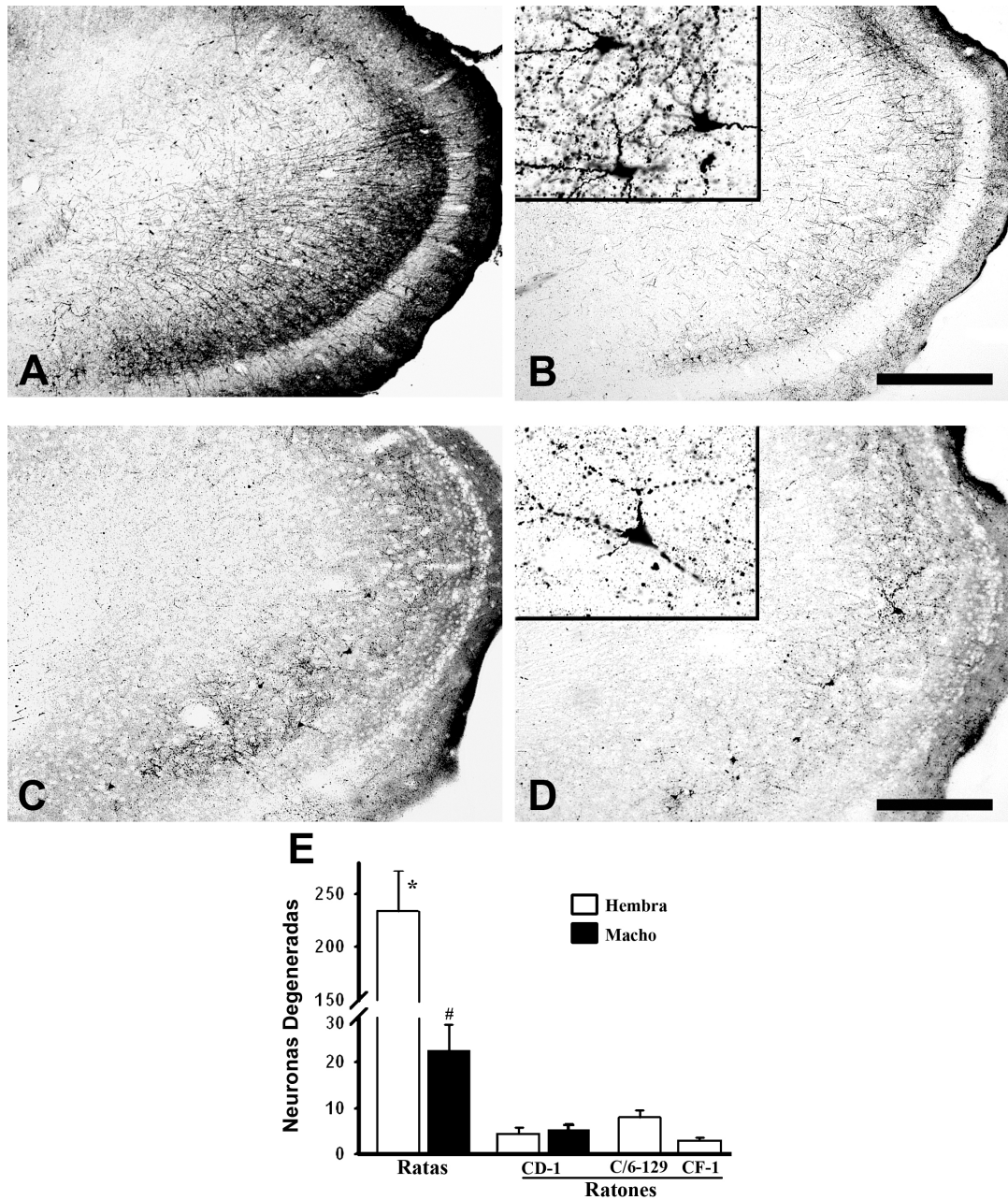


Fig. 12: Los ratones son menos sensibles que las ratas a los efectos neurotóxicos del MK801 y carecen del dimorfismo sexual. Cortes coronales de la corteza retrosplenial (RSC) de ratas (A y B) y ratones (C y D) hembras y machos (izquierda y derecha, respectivamente) que fueron teñidos con la técnica A-Cu-Ag para la detección de neurodegeneración. Nótese el dimorfismo sexual en las ratas donde la hembra (A) muestra mayor argirofilia que el macho (B); una diferencia que no se observa entre ratones hembras (C) y machos (D). Asimismo, la degeneración en los ratones es de menor magnitud aún cuando se compara con la rata macho. Escala de la barra 400 μ m en B y 200 μ m en D. En E la cuantificación de las neuronas degeneradas ($M \pm EE$) en la RSC de ratas y ratones de ambos sexos (ratas Wistar, ratones: CD-1, C57BL/6-129/Sv y CF-1). * $p < 0.0001$ ratas hembras vs todos los demás grupos, # $p < 0.001$ ratas macho respecto de todos los grupos de ratones.

Participación de receptores gabaérgicos en la muerte neuronal inducida por MK801

La administración sistémica de tiopental previene la degeneración inducida por MK801 en la RSC pero no en el PLCo

Como primera aproximación para evaluar si los receptores GABA-A participan en el mecanismo neurodegenerativo del MK801, se realizaron inyecciones sistémicas del agonista GABA-A tiopental y se evaluó la neurodegeneración en la RSC y el PLCo dos días después. Los animales fueron tratados con MK801 y coadministrados a las 0, 4 y 8 horas con 5 o 10 mg/kg de tiopental. La repetición de las administraciones fue para garantizar que la biodisponibilidad del tiopental fuese paralela a la intoxicación con MK801 y para evitar el uso de dosis anestésicas que asociadas con MK801 podrían resultar letales.

Los animales administrados únicamente con salina o con tiopental no mostraron ningún signo de neurodegeneración por lo que no fueron incluidos en el posterior análisis estadístico. La RSC de los animales tratados con MK801 y tiopental mostraron una disminución de la neurodegeneración del 52 ± 12 % y 97 ± 2 %, con la dosis de 15 y 30 mg, respectivamente, evidenciando un efecto protector dosis dependiente. En contraste, en el PLCo el tiopental ejerció efectos bifásicos provocando un aumento en la degeneración (93 ± 28 %) con la dosis de 15 mg mientras que no tuvo efectos significativos con la dosis de 30 mg (Figura 13 A-G) [ANOVA de dos vías: tratamiento ($F_{2,21} = 14.42$ $p < 0.001$), estructura cerebral ($F_{1,21} = 43.93$ $p < 0.0000$) y tratamiento x estructura ($F_{2,21} = 13.33$ $p < 0.001$). Post hoc LSD Fisher: Tiopental 15 mg vs Salina ($p < 0.01$), Tiop. 30 mg vs Salina ($p < 0.0001$), en RSC; y Tiop. 15 mg vs Salina ($p < 0.001$), en PLCo]. Los datos indican que la estimulación sistémica de receptores GABA-A es neuroprotectora en la RSC pero no en el PLCo, sugiriendo que diferentes mecanismos neurotóxicos operan en las distintas estructuras injuriadas por el MK801.

La administración intracerebroventricular de muscimol protege contra la degeneración inducida por MK801 en la RSC pero no en el PLCo

Para continuar evaluando si los receptores GABA-A son mediadores del efecto tóxico del MK801 se administró muscimol por vía i.c.v. en animales intoxicados con MK801. Esta aproximación pretendió superar dos limitaciones de los estudios anteriores: 1) minimizar posibles interacciones farmacocinéticas entre el agonista GABA y el MK801 que estén generando efectos protectores debido a una disminución en la biodisponibilidad

del MK801 y no al agonismo del receptor; 2) el muscimol es un agonista de mayor especificidad que el tiopental por los receptores GABA-A.

La administración i.c.v. de muscimol (sin MK801) resultó letal en dosis de 30 µg. En asociación con MK801, dosis de muscimol de 10 y 2.5 µg también resultaron mortales mientras que, 0.75 µg (dividida en dos inyecciones c/4 h.) no afectaron la viabilidad de los animales por lo que fueron las utilizadas para el experimento. Los animales tratados solamente con 0,75 µg de muscimol o PBS i.c.v. no mostraron ningún signo de neurodegeneración en la RSC ni en el PLCo por lo que no fueron incluidos en posteriores comparaciones. Los animales tratados con MK801 y coadministrados con muscimol evidenciaron un robusto efecto protector en la RSC ($90 \pm 2,7 \%$) pero no en el PLCo (Figura 13 H) [ANOVA de dos vías: tratamiento ($F_{1,20} = 17.35$ $p < 0.0001$), estructura cerebral ($F_{1,20} = 12.34$ $p < 0.01$) y tratamiento x estructura ($F_{1,20} = 13.04$ $p < 0.01$); seguido del post hoc LSD Fisher: Muscimol vs PBS en RSC ($p < 0.0001$)]. Los datos confirmaron que el agonismo GABA-A en el cerebro resulta protector en la RSC y no en el PLCo, reforzando la idea de que la pérdida de inhibición gabaérgica es un mecanismo de la neurotoxicidad inducida por MK801 en la RSC mientras dicha alteración no es relevante para la muerte de las neuronas del PLCo.

La administración de muscimol en la RSC es suficiente para prevenir la muerte neuronal inducida por MK801

Para indagar si la inhibición de la muerte neuronal encontrada con las administraciones sistémicas o i.c.v. se debía a la acción sobre los receptores GABA-A en la propia RSC, se inyectaron diferentes dosis de muscimol en un hemisferio de la RSC 30 minutos después del MK801 y la neurodegeneración fue evaluada 48 horas más tarde. La comparación en este caso fue realizada con el hemisferio contralateral (no inyectado) tanto en un sitio próximo a la inyección (a una distancia de 0.7 mm) como en un sitio alejado de la misma (3.5 mm), representando la porción posterior y anterior de la RSC, respectivamente.

Los animales tratados con muscimol mostraron una protección del $69 \pm 15 \%$ y $72 \pm 16 \%$ con dosis de 10 y 100 ng, respectivamente, específicamente asociada al sitio cercano a la inyección. La dosis de 1000 ng anuló completamente la muerte en el área cercana a la inyección y extendiendo su efecto protector hacia la zona distante, sugestivo de una amplia difusión de la droga (Figura 14 A-C) [ANOVA de dos vías: tratamiento ($F_{3,18} = 40.97$ $p < 0.0000$), distancia ($F_{1,18} = 21.61$ $p < 0.001$) y tratamiento x distancia ($F_{3,18} = 6.34$ $p < 0.01$). Post hoc LSD de Fisher comparando entre-grupos (cercano a la inyección):

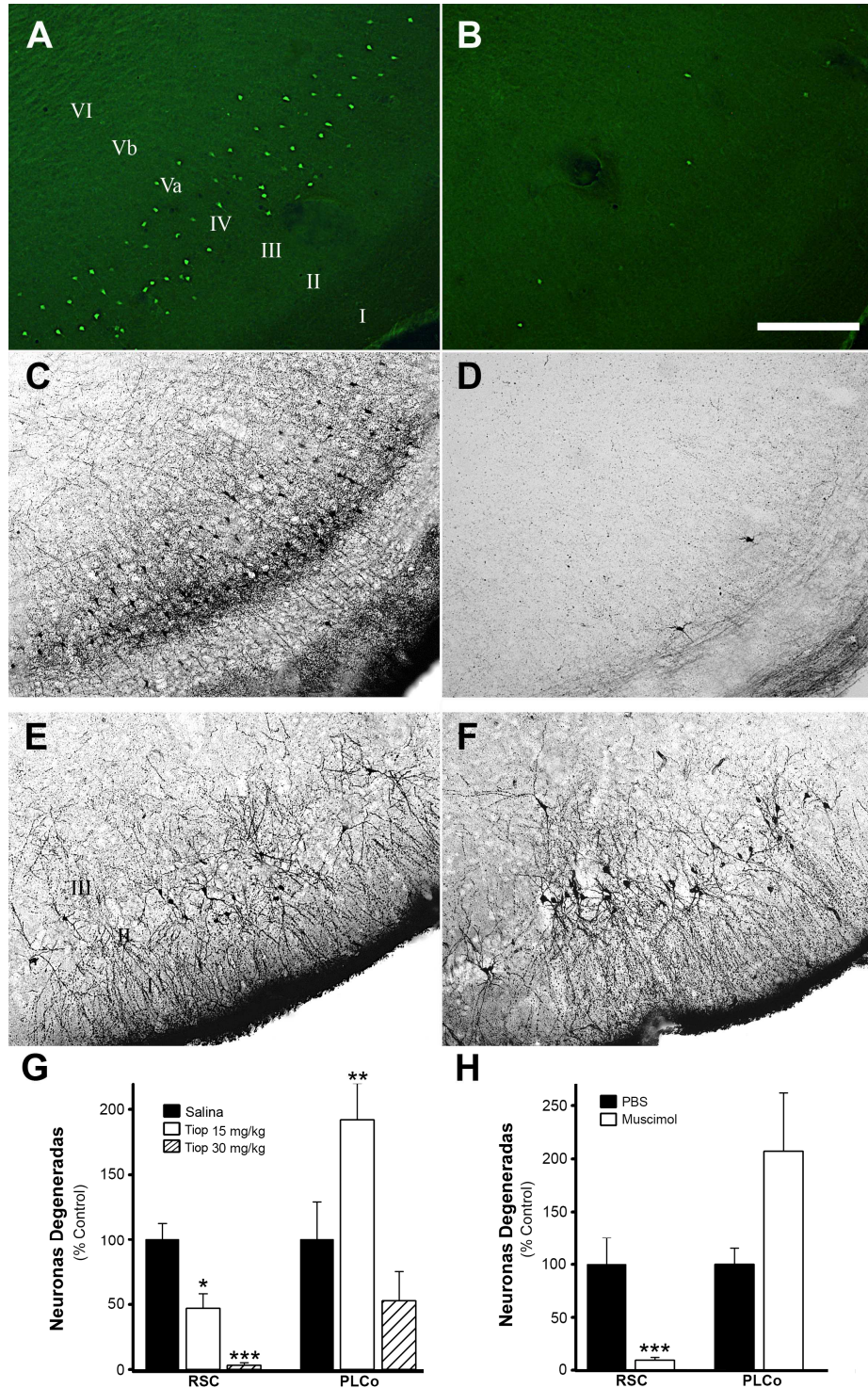


Fig. 13: Efecto protector de agonistas GABA-A en la RSC ante la neurodegeneración inducida por MK801. Cortes coronales de la corteza retrosplenial (RSC) y el núcleo amigdalino cortical posterolateral (PLCo) provenientes de animales administrados con MK801 (2.5 mg/kg i.p.) y salina o tiopental (30 mg/kg, i.p.) que fueron analizados (48 h. después) con las técnicas FJ-B y A-Cu-Ag para la detección de neurodegeneración. En **A** y **C** (FJ-B y A-Cu-Ag, respectivamente) observamos el patrón de muerte neuronal en la RSC característico de animales tratados con MK801 y salina. Las ratas tratadas con MK801 y tiopental presentaron marcada reducción de la neurodegeneración en la RSC (**B** y **D**) mientras que el mismo tratamiento no tuvo efectos en el PLCo (**E** y **F** control y tiopental, respectivamente). Escala de la barra 200 μ m (objetivo 10x). En **G** la cuantificación de la muerte neuronal de los experimentos con tiopental y en **H** de los experimentos con muscimol i.c.v. * $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ respecto del control: salina + MK801. Los valores están expresados en % respecto del control y reflejan la $M \pm EE$ correspondiente.

muscimol 0 vs 10 y 1000 ng ($p < 0.0001$), 100 ng ($p < 0.001$); comparando intra-grupos (cerca vs lejos) 10 ng ($p < 0.0001$) y 100 ng ($p < 0.01$).

El resultado demuestra que el agonismo GABA-A en la propia RSC es suficiente para prevenir el efecto neurodegenerativo del MK801 sugiriendo que la pérdida del tono inhibitorio en las neuronas vulnerables podría ser un elemento clave en el muerte neuronal.

Ventana temporal para la protección ejercida por muscimol ante los efectos neurodegenerativos del MK801

Los experimentos anteriores mostraron que el muscimol ejerció un potente efecto protector contra la muerte neuronal inducida por MK801. Para conocer el periodo temporal en el que puede prevenir la neurodegeneración, se aplicó una microinyección intra-RSC de 100 ng de muscimol a distintos tiempos (0.5, 5, 10 o 24 horas) luego de iniciada la intoxicación con MK801. Los animales tratados con muscimol mostraron una protección entre el 72 y 83 % hasta 10 horas después de administrado el MK801 mientras que su aplicación 24 horas después ya no revirtió el efecto degenerativo de la droga (Figura 14 D) [ANOVA de dos vías: tiempo ($F_{4,20} = 11.55$ $p < 0.0000$), distancia ($F_{1,20} = 45.45$ $p < 0.0000$) y tiempo x distancia ($F_{4,20} = 6.92$ $p < 0.01$). Post hoc LSD de Fisher comparando entre-grupos (cercano a la inyección): control vs muscimol a las 0.5, 5 y 10 h ($p < 0.0001$); comparando intra-grupos (cerca vs lejos) a las 0.5 h ($p < 0.01$), 5 h ($p < 0.0001$) y 10 h ($p < 0.001$)]. Estos resultados confirmaron el efecto protector del muscimol y demuestran que aún pasadas varias horas de iniciada la intoxicación es posible prevenir la neurotoxicidad del MK801 estimulando los receptores GABA-A de la RSC.

La picrotoxina intra-RSC no induce neurodegeneración ni altera la muerte neuronal inducida por MK801

Los resultados previos que mostraron protección con agonistas GABA-A sugieren que el MK801 inhibe neuronas gabaérgicas y que la consecuente disminución de la actividad inhibitoria a través del receptor GABA-A contribuye a la muerte. Sin embargo, el muscimol podría ejercer una protección por su efecto hiperpolarizante (alejando las neuronas del umbral excitotóxico) sin que esto implique que está “corrigiendo” una alteración inducida por el MK801 en el sistema gabaérgico. Para demostrar que la disminución de inhibición GABA-A en la RSC media la neurotoxicidad inducida por MK801, el bloqueo de receptores GABA-A *per se* debería inducir muerte neuronal o

incrementar la neurodegeneración inducida por el MK801. Ratas previamente canuladas fueron microinyectadas con picrotoxina en la RSC de animales sin tratamiento o intoxicados con MK801. Además otros animales recibieron 5 mg/kg de picrotoxina por vía i.p. para diferenciar efectos sistémicos de los locales.

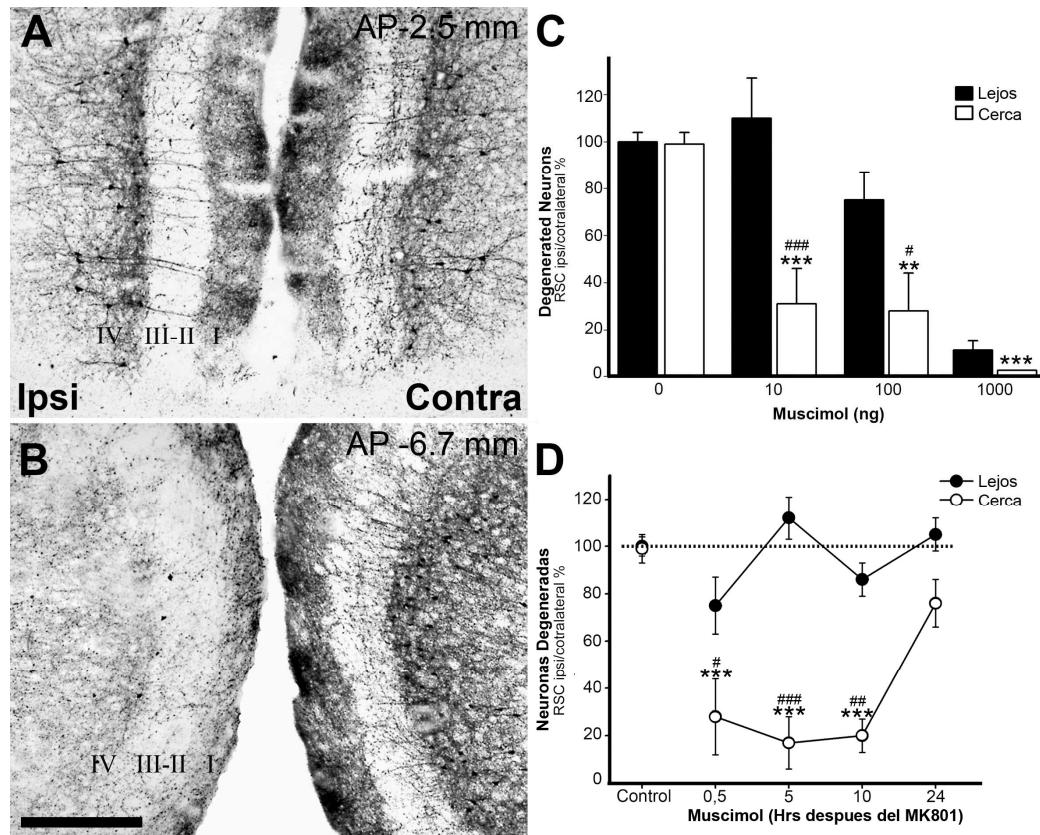


Fig. 14: Administración local de muscimol y ventana temporal de sus efectos protectivos frente al MK801. Cortes coronales de una rata que fue microinyectada en la corteza retrosplenial (RSC, Bregma -6.00) con una dosis de 10 ng de muscimol donde se observa, en **B**, una marcada inhibición de la muerte neuronal en el hemisferio inyectado que contrasta con la falta de efecto en el lado contralateral (no inyectado pero si canulado). En **A**, el mismo cerebro pero en un corte anterior (Bregma -2.5 mm) y alejado de la inyección (3.5 mm) donde no hay diferencias ipsi/contralaterales. La cuantificación con las distintas dosis de muscimol empleadas se detallan en **C**. Las barras representan el cociente ($M \pm EE$ en %) entre las neuronas degeneradas del hemisferio ipsilateral a la inyección vs. el hemisferio contralateral no inyectado, tanto en un sitio próximo a la administración (barras blancas) como en un nivel alejado de la misma (barras negras). En **D** se grafica la ventana temporal en la que se puede prevenir la neurodegeneración luego de iniciada la intoxicación con MK801 (0.5, 5, 10 o 24 horas). Los puntos representan el cociente ($M \pm EE$ en %) entre las neuronas degeneradas del hemisferio ipsilateral a la inyección vs. el hemisferio contralateral no inyectado, tanto en un sitio próximo a la administración (puntos blancos) como en un nivel alejado de la misma (puntos negros). ** $p < 0.001$ *** $p < 0.0001$ respecto al control (cerca); # $p < 0.01$ ### $p < 0.001$ #### $p < 0.0001$ respecto al sitio alejado (lejos) en la misma condición.

La administración de picrotoxina en dosis de 1200 ng, la cual provoca extensiva degeneración en otras estructuras (201), no indujo ningún signo de neurodegeneración ni efectos comportamentales evidentes mientras que las administraciones sistémicas provocaron convulsiones y la muerte de los animales a los 30 minutos de inyectada la

droga. Inesperadamente, ninguna de las dosis administradas en animales intoxicados con MK801 modificaron significativamente la muerte neuronal (Figura 15) (ANOVA: $F_{2,14} = 0.08$; $P > 0.92$). Los datos indican que la pérdida de inhibición GABA-A en la RSC no es suficiente para disparar procesos degenerativos ni incrementar el provocado por MK801. En conjunto los experimentos sugieren que el efecto protector del agonismo GABA-A ocurriría por contrarrestar un estado excitotóxico originado por activación de otros receptores; y que la pérdida de inhibición gabaérgica en las neuronas retrospleniales no sería un mecanismo que lleve a la muerte neuronal inducida por MK801.

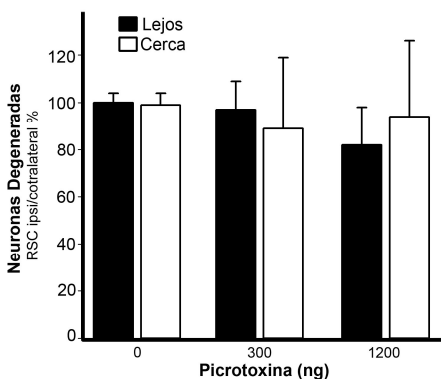


Fig. 15: Administración de picrotoxina en la RSC de animales tratados con MK801. Cuantificación de los casos tratados con MK801 y microinyectados con distintas dosis de picrotoxina (antagonista GABA-A) en la corteza retrosplenial (RSC). Las barras representan el cociente ($M \pm EE$ en %) entre las neuronas degeneradas del hemisferio ipsilateral a la inyección vs. el hemisferio contralateral no inyectado, tanto en un sitio próximo a la administración (barras blancas) como en un nivel alejado de la misma (barras negras). Ninguna de las dosis utilizadas modificó significativamente la muerte neuronal inducida por el MK801.

Niveles de GABA y glutamato en la corteza retrosplenial, corteza olfatoria y bulbo olfatorio en animales intoxicados con MK801

Los experimentos anteriores sugieren que la muerte neuronal inducida por MK801 es de tipo excitotóxica porque es contrarrestada por drogas que hiperpolarizan las membranas. Esto se refuerza con el análisis cualitativo de los preparados histológicos cuyos perfiles argirofílicos son consistentes con muerte por excitotoxicidad como las inducidas por análogos del glutamato (44). Para continuar evaluando el rol del sistema gabaérgico y explorar la posible participación del sistema glutamatérgico en los efectos neurodegenerativos del MK801 se procedió a medir los niveles de GABA y glutamato en animales tratados con la droga o con solución salina. Se realizaron homogenatos de la RSC y la corteza olfatoria (conteniendo al PLCo) en las que el MK801 induce muerte excitotóxica; y el bulbo olfatorio, donde el MK801 genera muerte apoptótica. Las mediciones se realizaron 8 o 24 horas después de la administración, tiempos que preceden el inicio de la muerte neuronal y el efecto techo de la misma, respectivamente.

Los datos obtenidos indicaron que no hubo alteraciones en los niveles de GABA en ninguna de las estructuras analizadas pero sí en los niveles de glutamato, los cuales se detectaron disminuidos a las 8 horas tanto en la RSC (16 %) (ANOVA $F_{2,22} = 3.71$; $P < 0.05$) como en la corteza olfatoria (20 %) (ANOVA $F_{2,22} = 3.57$; $P < 0.05$). No se registraron cambios en el bulbo olfatorio indicando que las alteraciones en los niveles del glutamato no son generalizadas (Figura 16). La disminución del glutamato en la RSC y la corteza olfatoria indica que este neurotransmisor se encuentra alterado en áreas donde hay muerte neuronal excitotóxica. Además, el decremento fue específico para este neurotransmisor ya que los niveles de GABA no se modificaron en ninguna de las estructuras estudiadas, reforzando la noción de que el MK801 no mediaría sus efectos neurodegenerativos alterando la transmisión gabaérgica. Así, los efectos protectores encontrados con agonistas GABA-A podrían atribuirse al efecto inhibitorio que contrarrestaría el estado excitotóxico que se originaría por alteraciones en el sistema glutamatérgico.

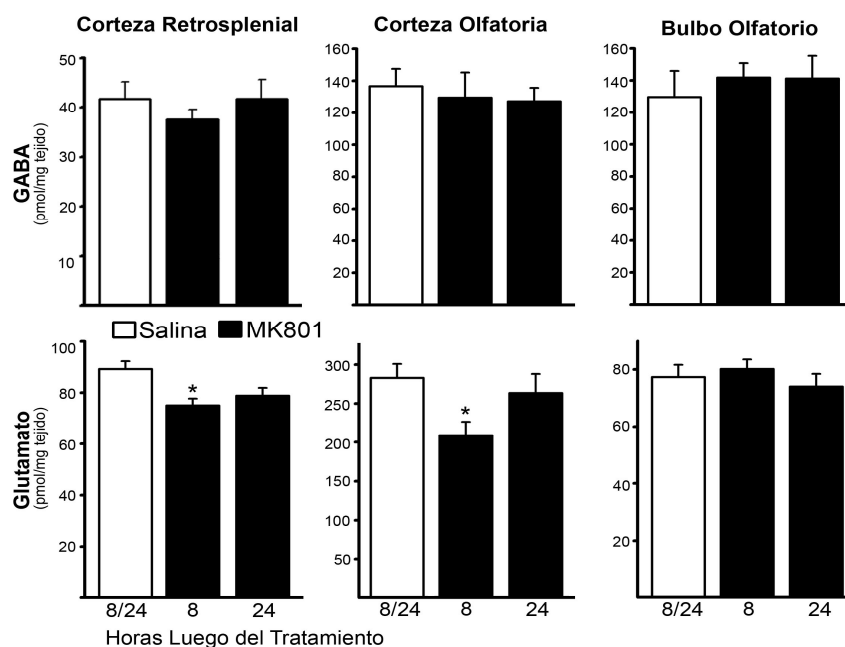


Fig. 16: Niveles de glutamato y GABA en animales tratados con MK801. Los niveles de neurotransmisores fueron valorados, empleando HPLC en homogenatos de la corteza retrosplenial, la corteza olfatoria y el bulbo olfatorio. Ratas hembras fueron cicladas y aquellas en periodo de diestro recibieron una inyección de MK801 (2.5 mg/kg) o salina i.p. Posteriormente, fueron decapitadas 8 o 24 horas luego de la administración de las soluciones. Las barras representan la $M \pm EE$ de las concentraciones del neurotransmisor expresadas como pmol/mg de tejido. No hubo alteraciones en los niveles de GABA en ninguna de las estructuras analizadas mientras que los niveles de glutamato se encuentran disminuidos a las 8 horas tanto en la RSC como en la corteza olfatoria. * $p < 0.05$ respecto al salina.

Participación de receptores glutamatergicos en la muerte neuronal inducida por MK801

La administración intra-RSC de MK801 no aumenta la degeneración inducida por la administración sistémica

Los experimentos anteriores sugieren que el sistema glutamatergico se encuentra alterado en áreas en las que el MK801 induce muerte excitotóxica y que la degeneración es inhibida localmente por drogas que hiperpolarizan la membrana neuronal, presumiblemente porque aleja a las neuronas del umbral excitotóxico. Como primera aproximación a la posible participación de receptores glutamatergicos en este fenómeno se administró 2.5 mg/kg de MK801 por vía i.p. y a distintos tiempos (0.5, 5, 10 o 24 horas) de iniciada la intoxicación se aplicó una microinyección de MK801 (3 µg) intra-RSC. Este experimento tuvo como primer objetivo testear si los receptores NMDA estaban involucrados en la toxicidad de la droga, particularmente en tiempos más tardíos de iniciada la intoxicación con MK801, cuando los niveles de MK801 en cerebro declinarían dejando los receptores NMDA libres de bloqueo. Asimismo, debido a que la dosis sistémica del MK801 está lejos del efecto techo, permitió evaluar si el bloqueo NMDA en la propia RSC es el responsable de los efectos degenerativos observados tras las administraciones sistémicas.

Los resultados mostraron una protección moderada pero significativa ($37 \pm 14 \%$) en el grupo administrado a las 5 horas (Figura 17) [ANOVA: tiempo; distancia ($F_{1,24} = 0,03$ $p < 0.9$) y tiempo x distancia ($F_{4,24} = 2.89$ $p < 0.05$). Post hoc LSD de Fisher: Control vs MK801 a las 5 h ($p < 0.01$), tanto cuando se compara entre-grupos (cercano a la inyección) como intra-grupos (cerca vs lejos)]. El hecho de que a ninguna sobrevida haya aumentado la muerte neuronal implica que las acciones del MK801 que conducen a la neurodegeneración con las administraciones sistémicas ocurren fuera de la RSC o, al menos, requieren de la contribución de otras estructuras que interactúan con esta corteza. Asimismo, la protección encontrada a las 5 horas de iniciada la intoxicación sugiere que en cierto periodo del proceso tóxico existen receptores NMDA no bloqueados por el MK801 que contribuyen, en algún grado, a los efectos degenerativos inducidos por las administraciones sistémicas de la droga.

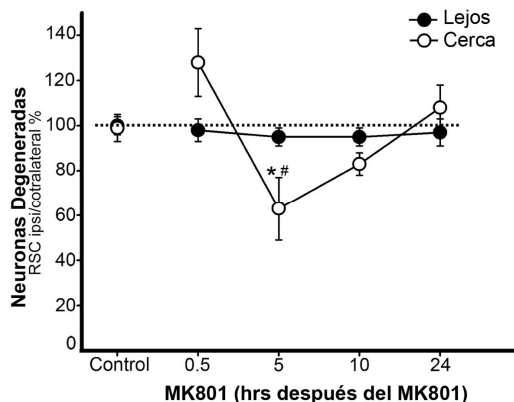


Fig. 17. Microinyecciones MK801 en la RSC a distintos tiempos luego de una intoxicación aguda con MK801. Los puntos representan el cociente ($M \pm EE$ en %) entre las neuronas degeneradas del hemisferio ipsilateral a la inyección vs. el hemisferio contralateral no inyectado, tanto en un sitio próximo a la administración (puntos blancos) como en un nivel alejado de la misma (puntos negros) a distintos tiempos (0.5, 5, 10 y 24 horas) luego de la administración de MK801. Los resultados mostraron un efecto significativo en el grupo administrado a las 5 horas. * $p < 0.01$ respecto al control (cerca); # $p < 0.01$ respecto al sitio alejado de la inyección (lejos) en la misma condición

La administración i.c.v. de DNQX previene la muerte neuronal inducida por MK801 en la RSC pero no en el PLCo

El experimento anterior indicó que la sobre-estimulación de receptores NMDA no sería mayormente relevante en la neurodegeneración inducida por α -NMDA. Así, el siguiente experimento inició una serie de evaluaciones tendientes a dilucidar si la sobreactivación de receptores AMPA/KA participa en el mecanismo neurotóxico del MK801. Para ello se administró por vía i.c.v. un antagonista selectivo de los receptores AMPA/KA (DNQX) y se valoró la muerte neuronal inducida por MK801 en la RSC y el PLCo.

Los animales tratados solamente con DNQX o DMSO (vehículo de la droga) no mostraron signos de neurodegeneración en la RSC ni en el PLCo. Estudios pilotos en animales tratados con MK801 y dosis crecientes de DNQX (2.5, 5, 10 μg repartidas en dos inyecciones c/4 horas) no arrojaron diferencias mientras que dosis de 70 μg resultaron letales. Por el contrario, inyecciones de 15 μg administradas a las 0, 4 y 8 horas después del MK801 resultaron viables y disminuyeron en un $70 \pm 12\%$ la muerte neuronal en la RSC pero no tuvieron efectos en el PLCo (Figura 18 A-C) [ANOVA de dos vías: tratamiento ($F_{1,18} = 10.82$ $p < 0.01$), estructura cerebral ($F_{1,18} = 22.71$ $p < 0.001$) y tratamiento x estructura ($F_{1,18} = 8.51$ $p < 0.01$); post hoc LSD de Fisher: DNQX vs DMSO en RSC ($p < 0.001$)]. Estos datos sugieren que la sobreactivación de receptores AMPA/KA es un factor clave en la neurodegeneración inducida por MK801 en la RSC. Por otro lado,

refuerzan la idea de que los mecanismos operantes en la RSC son distintos de los que llevan a la neurotoxicidad en el PLCo.

La administración intra-RSC de DNQX protege contra la muerte neuronal inducida por MK801

Debido a que un fármaco administrado i.c.v. difunde a todo el cerebro, el experimento anterior no define si la protección provista por el DNQX obedece al bloqueo de los receptores AMPA/KA en la propia RSC o si se ejerce indirectamente, afectando a estructuras que interactúan con esta corteza. Para indagar si el bloqueo AMPA/KA en la RSC es suficiente para ejercer un efecto protector se inyectaron distintas dosis de DNQX directamente en la RSC en animales tratados con MK801 y se evaluó la neurodegeneración 48 horas después en el lado ipsi y contralateral a la inyección tanto en un sitio cercano como alejado de la misma.

Los animales tratados con DNQX mostraron una protección específicamente asociada al sitio cercano a la inyección tanto con 0.5 μg ($72 \pm 7 \%$), 5 μg ($79 \pm 20 \%$) y 10 μg ($96 \pm 3 \%$) que fue estadísticamente significativa para cada dosis respecto de los controles (Figura 18 D) [ANOVA de dos vías: tratamiento ($F_{3,15} = 40.97$ $p < 0.001$), distancia ($F_{1,15} = 21.61$ $p < 0.0000$) y tratamiento x distancia ($F_{3,15} = 6.34$ $p < 0.001$). Post hoc LSD de Fisher comparando entre-grupos (cercano a la inyección): DNQX 0 vs 0.5, 5 y 10 μg ($p < 0.0001$); comparando intra-grupos (cerca vs lejos) 0.5 μg ($p < 0.0001$), 5 μg ($p < 0.01$) y 10 μg ($p < 0.001$)]. Estos datos indican que el bloqueo de los receptores AMPA/KA en la propia RSC es suficiente para impedir la muerte neuronal inducida por MK801 sugiriendo que la sobreactivación de dichos receptores en la RSC, probablemente en las propias neuronas vulnerables, es un disparador del efecto neurodegenerativo.

Ventana temporal para la protección ejercida por DNQX ante los efectos neurodegenerativos del MK801

Los experimentos anteriores mostraron que el bloqueo AMPA/KA previene la neurodegeneración inducida por MK801. Para evaluar el periodo temporal en el cual el bloqueo de receptores AMPA/KA es capaz de prevenir la degeneración inducida por MK801 se administró DNQX (5 μg) intra-RSC a las 0.5, 5, 10 o 24 horas después de iniciada la intoxicación con MK801.

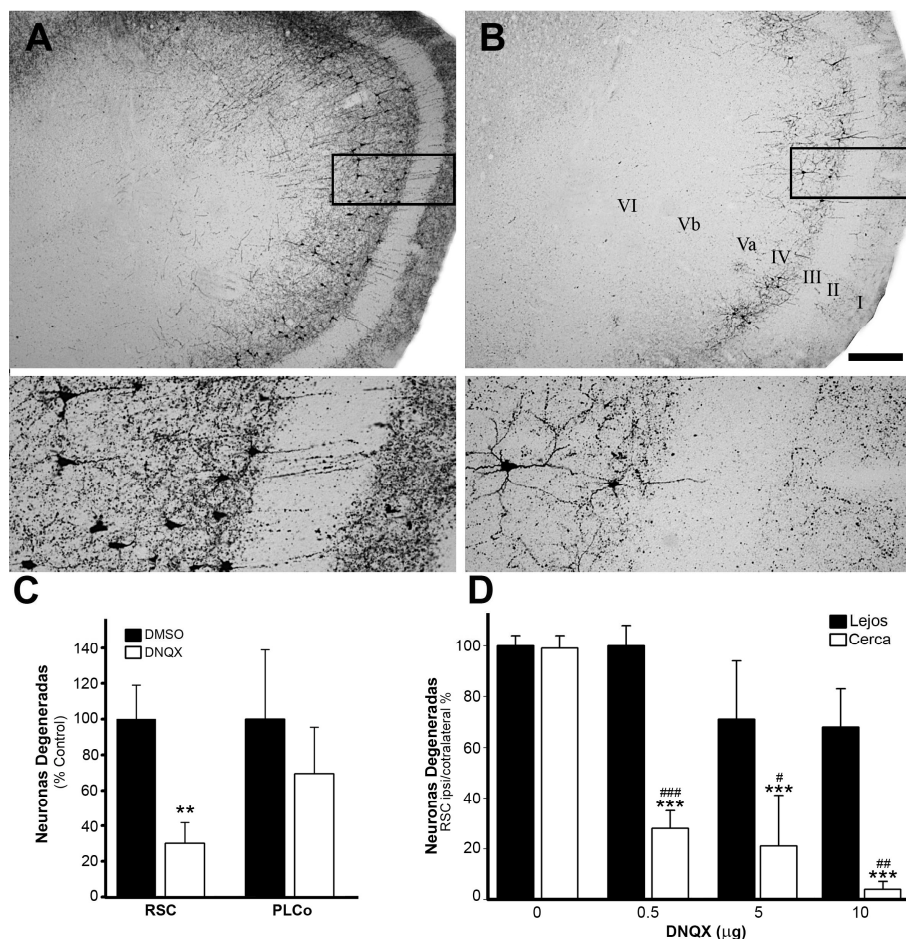


Fig. 18: Efecto protector de la administración de DNQX en la RSC pero no en el PLCo en animales tratados con MK801. Cortes coronales de la corteza retrosplenial (RSC) provenientes de animales administrados con MK801 (2.5 mg/kg i.p.) y DMSO (vehículo) o DNQX (45 μg i.c.v.) que fueron analizados 48 h. después con la técnica A-Cu-Ag para la detección de neurodegeneración. En **A**, un caso prototípico de los animales tratados con MK801 y vehículo donde se denotan las neuronas degeneradas como así también sus prolongaciones (ver inserto debajo). En **B**, un corte equivalente de un caso tratado con DNQX donde se constata el efecto inhibitorio de esta droga en la muerte neuronal inducida por el MK801. Escala de la barra 200 μm (objetivo 5x, recuadro inferior 40x). En **C** la cuantificación (M ± EE en %) en la RSC y en el núcleo amigdalino cortical posterolateral (PLCo) donde se confirma estadísticamente que la droga fue protectora solamente en la RSC. **p<0.001 respecto al control (MK801 + vehículo). En **D**, se observa el efecto protector con distintas dosis de DNQX microinyectadas en la RSC. Las barras representan el cociente (M ± EE en %) entre las neuronas degeneradas del hemisferio ipsilateral a la inyección vs. el hemisferio contralateral no inyectado, tanto en un sitio próximo a la administración (barras blancas) como en un nivel alejado de la misma (barras negras). ***p<0.0001 respecto al control (cerca); #p<0.01 ###p<0.001 ####p<0.0001 respecto al sitio alejado (lejos) en la misma condición.

Similar a lo observado con muscimol, los animales tratados con DNQX mostraron una protección entre el 76 y 87 % hasta las 10 horas post administración del MK801 mientras que a las 24 horas ya no hubo efectos (Figura 19 A) [ANOVA de dos vías: tiempo ($F_{4,17} = 10.73$ p<0.001), distancia ($F_{1,17} = 61.72$ p<0.0000) y tiempo x distancia ($F_{4,17} = 11.79$ p<0.0001). Post hoc LSD de Fisher comparando entre-grupos (cerca a la inyección): Control vs DNQX a las 0.5, 5 y 10 h (p<0.0001); comparando intra-grupos (cerca vs lejos) 0.5 h (p<0.01), a las 5 y 10 h (p<0.0001)]. Estos resultados confirmaron

que la sobreactivación de receptores AMPA/KA contribuye a la muerte neuronal inducida por a-NMDA y sugieren que probablemente sea necesaria una estimulación sostenida de al menos 10 horas para que sea letal para las neuronas.

La administración intra-RSC de NASPM ejerce una protección moderada contra la degeneración inducida por MK801

Continuando con la evaluación de receptores glutamatérgicos y siguiendo el diseño del experimento anterior se administró NASPM, un antagonista selectivo de una subpoblación de receptores AMPA/KA que son permeables al calcio, lo que los convertía en potenciales responsables de la neurodegeneración inducida por sobre-estimulación AMPA/KA (166). Los resultados indicaron que el NASPM fue parcialmente protector cuando administrado a las 5 ($37 \pm 8 \%$) ó 10 horas ($45 \pm 8 \%$) luego de la intoxicación con MK801 (Figura 19 B) [ANOVA de dos vías: tiempo ($F_{4,24} = 4.64$ $p < 0.01$), distancia ($F_{1,24} = 7.79$ $p < 0.05$) y tiempo x distancia ($F_{4,24} = 5.96$ $p < 0.01$). LSD Fisher post hoc: Control vs NASPM a las 5 h ($p < 0.001$) y 10 h ($p < 0.0001$), tanto cuando se compara entre-grupos (cercano a la inyección) como intra-grupos (cerca vs lejos)]. Estos resultados sugieren que en cierto periodo del proceso tóxico inducido por MK801 la neurodegeneración es mediada, al menos en parte, por los receptores AMPA/KA permeables al calcio.

La administración intra-RSC de CaEDTA no produjo cambios significativos en la neurodegeneración inducida por MK801

Los receptores AMPA/KA permeables al calcio son también altamente permeables al zinc y es conocido que la acumulación intracelular de este catión puede provocar neurodegeneración (Paoletti et al., 2009). Basados en esto y en los resultados del experimento anterior con NASPM se evaluó el efecto de CaEDTA, un quelante de zinc que no atraviesa la membrana celular, siguiendo la misma metodología que en los experimentos anteriores. La administración local de CaEDTA a distintos tiempos post-administración del MK801 (0.5, 5, 10 y 24 horas) no tuvo efectos significativos (Fig. 19 C) (ANOVA: $F_{4,24} = 0.51$; $P > 0.73$). Estos resultados sugieren que el zinc no mediaría los efectos degenerativos del MK801.

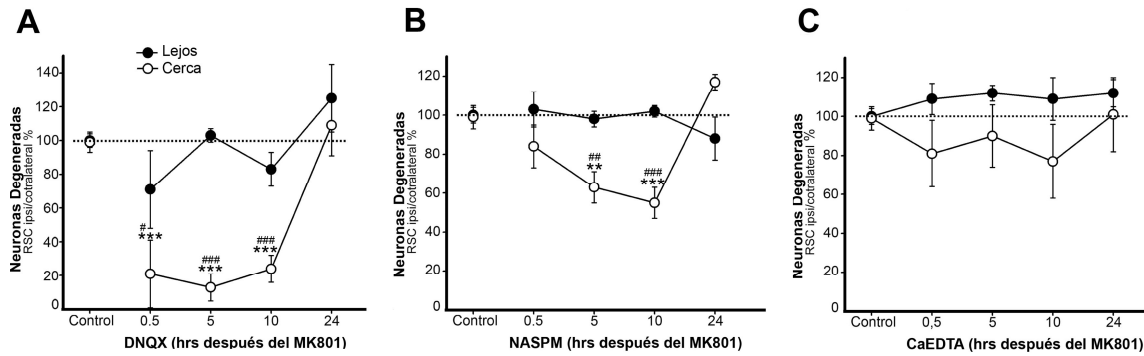


Fig. 19. Microinyecciones de DNQX, NASPM y CaEDTA en la RSC a distintos tiempos luego de una intoxicación aguda con MK801. Las puntos representan el cociente ($M \pm EE$ en %) entre las neuronas degeneradas del hemisferio ipsilateral a la inyección vs. el hemisferio contralateral no inyectado, tanto en un sitio próximo a la administración (puntos blancos) como en un nivel alejado de la misma (puntos negros) a distintos tiempos (0.5, 5, 10 y 24 horas) luego de la administración i.p. de MK801. En **A**, se muestra el efecto de DNQX (5 μ g intra RSC), antagonista de receptores AMPA/KA, que generó protección de similar magnitud hasta las 10 horas mientras que a las 24 horas ya no tuvo efectos. *** $p < 0.0001$ respecto al control (cerca) # $p < 0.01$ ### $p < 0.0001$ respecto al sitio alejado de la inyección (lejos) en la misma condición. En **B**, se grafica el efecto de NASPM (10 μ g intra-RSC), antagonista de receptores AMPA/KA permeables al calcio, el cual resultó parcialmente protector cuando se administró a las 5 y 10 horas luego de iniciada la intoxicación con MK801. ** $p < 0.001$ *** $p < 0.0001$ respecto al control (cerca); ## $p < 0.001$ ### $p < 0.0001$ respecto al sitio alejado de la inyección (lejos) en la misma condición. En **C**, se expone los resultados obtenidos con CaEDTA, quelante del zinc sináptico, el cual no tuvo efectos significativos.

La administración intra-RSC de AMPA y ácido kaínico en la corteza retrosplenial remedia varios aspectos de la neurodegeneración inducida por MK801

Los experimentos anteriores sugieren que una sobre-estimulación persistente de receptores AMPA/KA sería el gatillador de la muerte neuronal inducida por el MK801. Para evaluar si la sobre-estimulación de dichos receptores es suficiente para inducir la muerte en las neuronas vulnerables al MK801, se realizaron inyecciones locales de agonistas selectivos de receptores AMPA y KA. Para ello se canularon ratas en la RSC y se administraron diferentes dosis de AMPA o ácido kaínico y 48 horas después los cerebros se procesaron con las técnicas A-Cu-Ag y FJ-B.

Ambas drogas indujeron sistemáticamente neurodegeneración en la RSC pero con diferencias en las capas afectadas. Las inyecciones de AMPA emularon parcialmente la degeneración del MK801 por cuanto respetaron las capas II y III y por la degeneración somatodendrítica que indujeron en las laminas IV y Va y la degeneración terminal en capa I, que son las afectadas por el MK801. Sin embargo, las capas profundas (Vb y VI) también presentaron neurodegeneración mientras que con el MK801 jamás se vieron afectadas. Los casos tratados con kaínico exhibieron muerte en las capas IV y Va (respetando las capas II y III), y también, al contrario de AMPA, respetaron las capas Vb y VI generando así un cuadro extremadamente similar al inducido por MK801 (Figura 20 A-

C). Más aún, en los cortes posteriores a la inyección (entre 0.5 y 1,5 mm) la semejanza en el cuadro neurotóxico es mayor por cuanto afecta, al igual que el MK801, mayormente a la subdivisión granular de esta corteza (Figura 20 D-E). Asimismo, coinciden en la presencia de terminales degeneradas en la capa I, aunque en el caso del kaínico son mucho más profundas. Algunos casos fueron co-teñidos con rojo neutro para determinar fehacientemente la localización laminar de las neuronas degeneradas confirmándose que la degeneración somática inducida por ácido kaínico y MK801 afecta principalmente a las capas IV y V (Figura 21).

Es importante destacar que tal cuadro se observó con ambas técnicas, aunque con la A-Cu-Ag el parecido es menos aparente. Esto probablemente se debe a la sensibilidad de este método para la detección de procesos y terminales axónicos degenerados que sobreabunda en los casos tratados con kaínico (Figura 20 D-E) porque la inyección también causa degeneración en la corteza visual adyacente (no mostrado), probablemente por difusión, la cual envía proyecciones a la RSC (202). Estas diferencias también pueden adjudicarse a que la sobre-estimulación AMPA/KA ejercida por el agonista directo difícilmente sea totalmente equiparable a la hiperfunción de esos receptores inducida indirectamente por el MK801 (e.g. duración y/o intensidad del estímulo, sumación o sinergismo con otras alteraciones neuroquímicas, etc.). Sin embargo, revelan que las neuronas retrosplénicas de las capas IV y V son selectivamente vulnerables a la excitotoxicidad inducida por sobre-estimulación de receptores AMPA/KA.

En conjunto con los experimentos con antagonistas indican fuertemente que la sobre-activación de receptores AMPA/KA es un elemento clave en la neurodegeneración inducida por MK801 en la RSC.

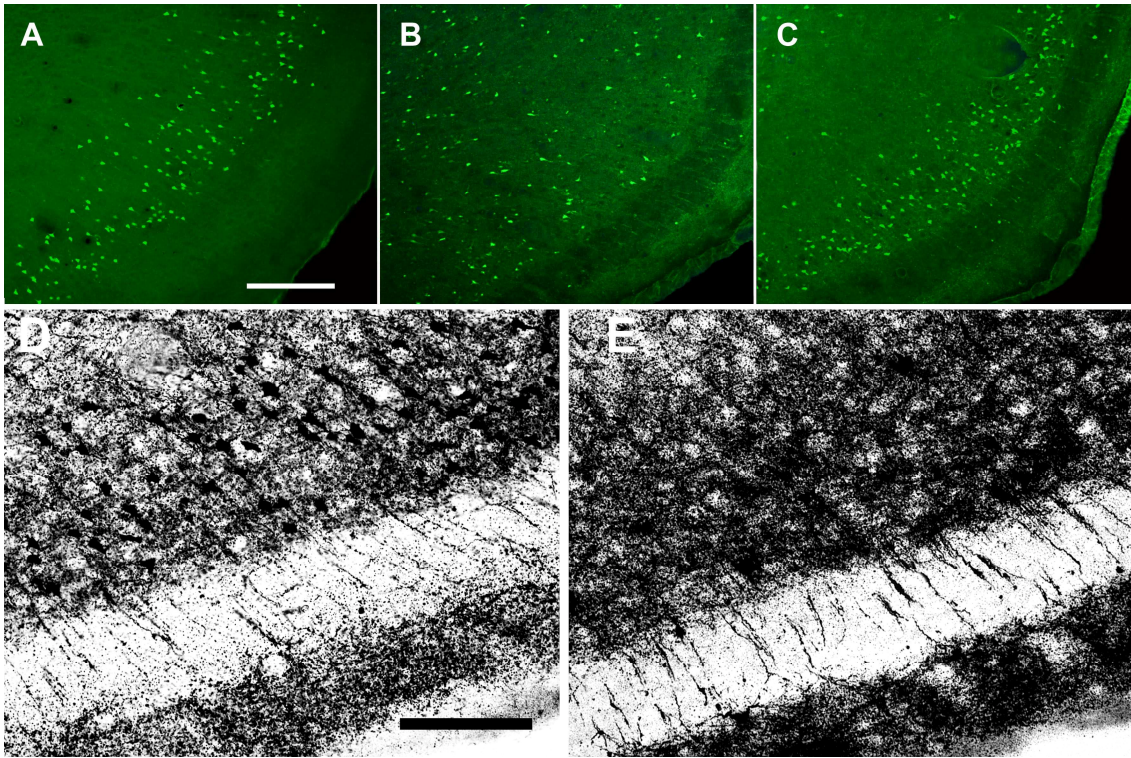


Fig. 20: Comparación del efecto neurodegenerativo de microinyecciones de agonistas AMPA y KA en la corteza retrosplenial con la muerte neuronal inducida por MK801. En A-C cortes coronales de la RSC revelados con FJ-B de animales que fueron inyectados con una dosis i.p. de 5 mg/kg de MK801 (A), o intra-RSC con 2.5 nmoles de AMPA (B) o ácido kaínico (C). Nótese que los casos tratados con kaínico presentan una notable similitud con el cuadro del MK801. Escala de la barra 200 μ m. En D y E cortes coronales teñidos con la técnica A-Cu-Ag de un caso administrado con 5 mg/kg de MK801 por vía i.p. (D) y otro, con 2.5 nmoles de ácido kaínico intra-RSC (E). Nótese la similitud de la neurodegeneración con ambos tratamientos involucrando muerte somática en las capas IV y Va y degeneración axónica y terminal en esas capas y en la capa I que respetan las capas II y III, presentando algunas dendritas apicales que la atraviesan. Escala de la barra 100 μ m.

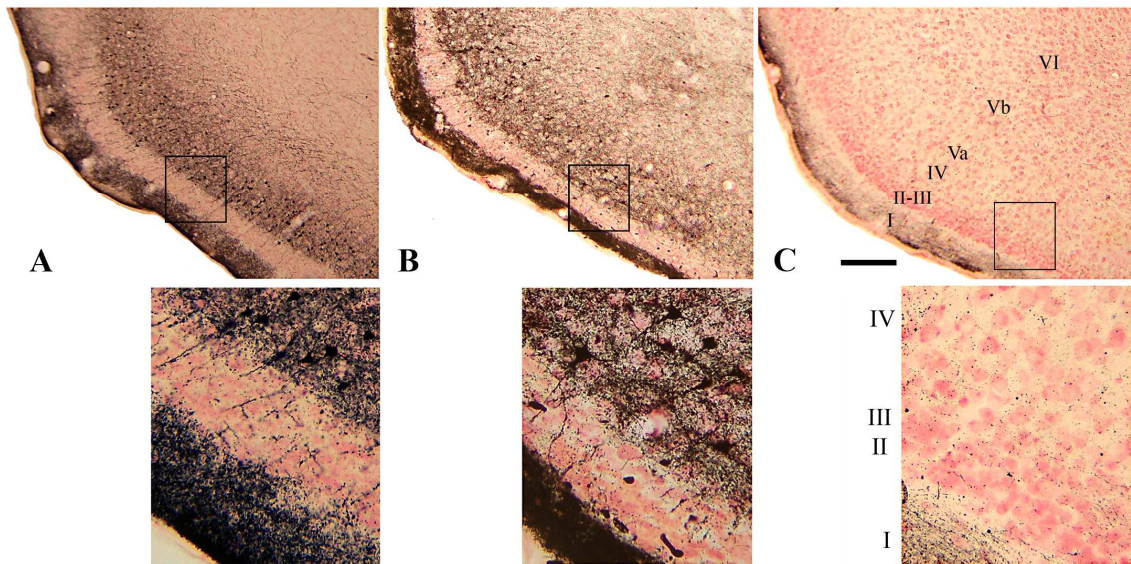


Fig. 21: Doble tinción con la técnicas A-Cu-Ag y rojo neutro en animales tratados con MK801 y ácido kaínico. En A, un caso tratado con 5 mg/kg i.p. de MK801; en B, una rata tratada con 2.5 nmoles de ácido kaínico intra-RSC y en C, el hemisferio contralateral de este mismo caso que sirve como control. La tinción del rojo neutro colorea el soma neuronal (color rosado) permitiendo identificar con precisión las capas en las que se encuentran las células en estado degenerativo detectadas con la técnica A-Cu-Ag (color negro). Escala de la barra 100 μ m.

Capítulo 4
DISCUSIÓN

En animales adultos el bloqueo de los receptores NMDA puede inducir muerte neuronal en la RSC y otras estructuras corticolímbicas. Diversas investigaciones han señalado que varios sistemas de neurotransmisión parecen estar involucrados en los efectos celulares y comportamentales inducidos por a-NMDA. Sin embargo, muy pocos trabajos han abordado el estudio del mecanismo de la muerte neuronal. Esto es importante desde que los déficits funcionales a largo plazo que se observan en personas y animales que se auto/administran con a-NMDA, probablemente estén vinculados a la neurodegeneración inducida por la droga y no a los efectos reversibles que cursan durante la intoxicación. Por otro lado, en la mayoría de los experimentos realizados se han modulado los receptores en estudio mediante fármacos administrados sistémicamente, cabiendo así la posibilidad de que los efectos protectores encontrados se deriven de acciones indirectas de las drogas o aun de alteraciones farmacocinéticas que disminuyan la biodisponibilidad del a-NMDA.

La bibliografía previa indicaba que no es el antagonismo NMDA *per se* el gatillador del efecto neurotóxico, sino que éste sería consecuencia de un complejo desbalance en la neurotransmisión que conduce a la sobre-estimulación y/o hipofunción de los receptores de los neurotransmisores alterados. Los experimentos que integran esta tesis se diseñaron para indagar la participación de receptores D2/D4, GABA-A, AMPA/KA, AMPA/KA permeables al calcio, NMDA, y del zinc sináptico, enfatizando la dependencia temporal de su compromiso y el sitio neuroanatómico de acción de los fármacos. Complementariamente, se midieron los niveles de GABA y glutamato en homogenatos de corteza cerebral y se trabajó con animales transgénicos que carecen de receptores dopaminérgicos. Derivado de este último experimento surgió subsidiariamente el objetivo de comparar entre ratas y ratones la degeneración inducida por MK801.

Los principales hallazgos de este trabajo y las conclusiones que pueden derivarse de ellos se discuten a continuación.

Diferencias entre ratas y ratones en la neurodegeneración inducida por MK801

Los experimentos realizados en ratones transgénicos para evaluar el rol de receptores dopaminérgicos revelaron inesperadas diferencias entre las ratas y los ratones (tanto con los KO como con los controles normales) en el patrón y magnitud de muerte neuronal inducida por el MK801. Este hecho instó a caracterizar la neurodegeneración inducida por MK801 en otras cepas de ratones permitiendo descartar que no se trate de una particularidad de la cepa de ratones utilizada originalmente (CF-1). Dichos trabajos confirmaron que cuando ratas y ratones son sometidos a una administración aguda de MK801 los ratones son menos sensibles que las ratas al efecto neurodegenerativo y que

además carecen del dimorfismo sexual. En las tres cepas estudiadas (CF-1; C57BL/6-129/Sv; CD-1) la degeneración neuronal estuvo circunscripta a la RSC, el MOB y CA1 siendo este patrón idéntico tanto en machos como en hembras. En contraste, las ratas hembras muestran mayor sensibilidad a los efectos degenerativos que los machos y comparadas con los ratones presentan neurodegeneración de magnitud mucho mayor no sólo en la RSC, MOB y CA1 sino también en otras áreas (PLCo, corteza piriforme, giro dentado, neocorteza) que en los ratones no se ven afectadas incluso si se utilizan dosis 16 veces mayores.

El análisis cuantitativo reveló que más de 230 neuronas aparecen degeneradas en una hemisección de la RSC en ratas mientras que en los ratones el promedio es de 5 neuronas. Estudios estereológicos han mostrado que las ratas tienen aproximadamente 2.8 veces la cantidad de neuronas corticales que posee el ratón (88). Consecuentemente, esta diferencia anatómica sólo puede explicar una parte limitada de los diferentes perfiles neurotoxicológicos reportados.

Varios factores pueden causar las diferencias entre estas especies de roedores. Los ratones podrían metabolizar y/o eliminar el MK801 más eficientemente que las ratas, generando una menor biodisponibilidad del psicotrópico. Lamentablemente, no se han realizado estudios farmacocinéticos con a-NMDA en ratones pero observaciones comportamentales circunstanciales apoyan la hipótesis farmacocinética. Por ejemplo, consistentemente pasadas 24 horas de la administración con MK801 los ratones retornaban a la "normalidad" siendo indistinguibles de los tratados con salina mientras que las ratas inyectadas con MK801 permanecían severamente afectadas (inmovilidad, ataxia) durante los tres días post inyección. Con otras drogas, como el etanol, se ha descrito que después de suministrar igual dosis a ratas y ratones, el alcohol es eliminado más rápidamente por estos últimos (126).

Por otro lado, la probable intervención de este factor no descarta que las diferencias entre ratas y ratones puedan ser también causadas por particularidades en la organización quimio-estructural del cerebro del ratón. Se ha postulado que la hiperactivación de vías colinérgicas, inducida indirectamente por el bloqueo de receptores NMDA en neuronas GABAérgicas, juega un rol crítico en la neurotoxicidad del MK801 (30, 69). El hecho de que el ratón carezca de neuronas colinérgicas corticales que en cambio si están presentes en la rata (114) podría contribuir a su menor vulnerabilidad frente al MK801.

Otra diferencia entre especies observada fue que la fragmentación neuronal propia de las neuronas degenerativas comienza a visualizarse más temprano en los ratones que en las ratas. Esto sugiere que la neurodegeneración inducida por MK801 progresa más rápidamente en ratones. Similares observaciones se han hecho respecto a los efectos neurotóxicos del ácido kaínico en ratas y ratones (13). Sin embargo, hubo similitudes en

el tipo de neurodegeneración observada, tanto en ratas como en ratones las neuronas argirofílicas del MOB presentaron morfología apoptótica mientras que en RSC tenían morfología de tipo excitotóxica, sugiriendo que distintos mecanismos de muerte celular están conservados entre las especies.

Es interesante señalar que contrario al modelo polisináptico indirecto que operaría en la muerte excitotóxica de la RSC, distintas líneas de evidencia permiten especular que la muerte neuronal inducida por MK801 en el MOB podría ser directa, es decir que aquellas neuronas con receptores NMDA bloqueados por el MK801 serían las que sufrirían el proceso neurodegenerativo. Evidencias provistas por estudios en animales en desarrollo en los cuales, al igual que en el bulbo olfatorio de los animales adultos, hay apoptosis normal muestran que cuando son expuestos a drogas a-NMDA ese patrón de muerte fisiológica normal se incrementa dramáticamente en varias áreas cerebrales (92) incluida el MOB (71). Subsecuentes estudios han demostrado que en ese periodo ontogenético (etapa pre y postnatal temprana de la rata) la activación del receptor NMDA, a través de la liberación de glutamato, sirve como señal de supervivencia neuronal y que cuando es eliminada (sea por manipulaciones experimentales o debido a la falta de las acciones tróficas del glutamato, en el proceso natural de eliminación de células redundantes) las neuronas disparan el programa genético de muerte neuronal (107).

¿Por que el MOB de un animal adulto respondería al MK801 de igual manera que los animales en desarrollo mientras que esto no ocurre en el resto del cerebro? El MOB es una de las pocas áreas que aún en la adultez continua con la generación de nuevas neuronas (83) precisamente en las capas granular y periglomerular que son las afectadas por el MK801. Asimismo, se ha reportado que en animales adultos la anulación de las vías olfatorias primarias induce un marcado aumento de la apoptosis de las células granulares generadas en la adultez (129, 213) las cuales reciben *inputs* glutamatérgicos de las células mitrales que actúan principalmente a través de receptores NMDA presentes en las células granulares (182). En conjunto, estas observaciones permiten conjeturar que la neurogenesis en el MOB adulto recapitularía la dependencia trófica del glutamato y que la activación del receptor NMDA traduce esta señalización en cadenas intracelulares que favorecen la supervivencia neuronal. Cuando están ausentes por el bloqueo farmacológico inducido por el MK801 disparan la muerte celular programada.

Participación de receptores dopaminérgicos D2 y D4

Los experimentos realizados con el antagonista dopaminérgico haloperidol en animales tratados con MK801 mostraron protección en el PLCo pero no en la RSC, sugiriendo que los receptores dopaminérgicos juegan un rol en la neurotoxicidad inducida por MK801 en el núcleo amigdalino pero no en la RSC. Si tenemos en cuenta que el

PLCo está ricamente inervado por terminales dopaminérgicos (62) y que (al menos en otras estructuras) la administración de MK801 induce un aumento en la liberación de dopamina (111, 192), es probable que una acumulación de este transmisor pudiera tener efectos degenerativos. De hecho, la aplicación de altas concentraciones de dopamina tanto *in vitro* (3) como *in vivo* (87, 173) causa muerte neuronal.

Es interesante señalar que la administración sistémica de anfetamina, la cual provoca un aumento en la liberación de la dopamina endógena, induce un patrón de muerte celular muy similar al provocado por MK801 en el PLCo. Más aún, en un experimento en el que se aplicaron dosis sub-neurodegenerativas de MK801 en animales tratados con anfetaminas, se observó una potenciación de la muerte neuronal inducida por esa droga en la corteza amigdalina (18). Esto sugiere que el MK801 compartiría mecanismos de muerte con el psicoestimulante, presumiblemente mediante sobre-estimulación de receptores dopaminérgicos en las neuronas que sufren el daño.

En ese mismo estudio reportaron que la muerte neuronal inducida por anfetaminas es prevenida por el antagonismo de receptores D1 pero no por el bloqueo de receptores D2. Dado que el haloperidol es también un antagonista de los receptores D1, es posible que el efecto protector en el modelo experimental utilizado en este trabajo también esté mediado por esos receptores. Congruente con esta interpretación, la administración de un antagonista D1 previene la inducción de HSP70 (medida de estrés celular) en la corteza olfatoria (incluida el PLCo) en animales tratados con PCP (183).

Estudios moleculares realizados en neuroblastomas humanos indican que la elevación de las concentraciones de dopamina puede ejercer sus efectos citotóxicos mediante dos cascadas de señalización inicialmente independientes. Por un lado, la autooxidación de la dopamina genera radicales libres como el peroxinitrito (ONOO), que activa la proteinkinasa activada por mitógenos P38 (P38 MAPK) y la kinasa n-terminal c-jun (JNK). Por otro lado, la sobre-estimulación D1 en la membrana sináptica estimula la producción de la proteína kinasa A (PKA) que activa las protequinas activadas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2). A su turno, los mensajeros intracelulares convergen en la fosforilación de otras proteínas kinasas que activan la sintasa del óxido nítrico (NOS) resultando en una elevación del óxido nítrico (NO) que causa muerte celular (39). Recientes estudios que mapearon cientos de genes que son activados por estimulación selectiva de los receptores D1 identificaron que el retículo endoplasmático es una organela particularmente sensible a esta injuria, y que las cascadas de señalización derivadas del estrés reticular son también mediadoras de la muerte celular inducida por la sobre-estimulación dopaminérgica (97).

Alternativamente, la protección del haloperidol podría estar mediada por el bloqueo de receptores D2 en neuronas gabaérgicas que proyectan a las neuronas injuriadas. Uno de los modelos explicativos de cómo los α -NMDA podrían dañar las neuronas postula que

el MK801 bloquea los receptores NMDA de neuronas gabaérgicas disminuyendo la actividad inhibitoria que estas ejercen sobre vías excitatórias que, una vez desinhibidas, se tornan excitotóxicas (163). Siguiendo ese modelo se ha propuesto que el bloqueo de los receptores D2 en las mismas neuronas gabaérgicas les devolvería la actividad inhibitoria, ya que se eliminaría la inhibición normal que las células gabaérgicas reciben cuando vías dopaminérgicas actúan sobre el receptor D2 (185, 200).

Mientras que esta hipótesis involucra a los receptores D2 en el efecto neuroprotector del haloperidol, no necesariamente implica que dichos receptores participen en el mecanismo neurotóxico del MK801. Dado que los α -NMDA aumentan la liberación de dopamina (111, 192) y que la estimulación de receptores D2 disminuye la liberación de GABA (176), es posible que el MK801 suprima la actividad de neuronas gabaérgicas con mayor intensidad en aquellas que reciben inervación dopaminérgica. Esto podría explicar la selectividad del proceso neurotóxico inducido por α -NMDA, ya que neuronas gabaérgicas que regulan el disparo de vías glutamatérgicas y colinérgicas existen en muchas partes del cerebro donde no hay cambios neurotóxicos (82, 124).

Sin embargo, este modelo explicativo elaborado a partir de estudios que midieron signos reversibles de estrés celular en la RSC, es inadecuado para explicar los efectos en el PLCo de acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo y en otros laboratorios. Específicamente, aquí se observó que la administración de agonistas gabaérgicos y antagonistas glutamatérgicos no protegieron de la muerte neuronal en el PLCo. En la misma dirección, Colbourne y colaboradores (30) tampoco lograron alteraciones en la neurodegeneración de las regiones olfatorias con distintos regimenes de escopolamina, clásico antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos. El hecho que ciertas drogas previenen la neurotoxicidad en el PLCo y no en la RSC (haloperidol), y viceversa (DNQX, Tiopental, escopolamina), indica que cada estructura tiene su propia vulnerabilidad por lo que los mecanismos no pueden ser generalizados a partir de los resultados obtenidos en una sola estructura.

La falta de efecto protector del haloperidol en la RSC de ratas concuerda con la ausencia de diferencias encontradas entre las cepas carentes en receptores D2 y D4 y los normales (que sí expresan dichos receptores), lo que refuerza la hipótesis de que el sistema dopaminérgico no es relevante para la degeneración inducida por MK801 en la RSC. Diferencias en la quimio-arquitectura de las distintas áreas pueden ser responsables de que el sistema dopaminérgico participe en el PLCo pero no en la RSC. Por ejemplo, la innervación dopaminérgica es de menor magnitud en la RSC que en el PLCo (62, 156, 180).

La tendencia del haloperidol a aumentar la degeneración en la RSC es congruente con estudios de recaptación de glucosa (indicativo de la actividad metabólica) en los que reportaron que el haloperidol potenció el aumento de actividad neuronal inducida por KET

en la RSC (55). Esto indicaría que el efecto predominante del haloperidol en la RSC sería un aumento de la excitabilidad por el bloqueo de receptores D2 (inhibitorios) en las neuronas injuriadas. Curiosamente, algunos estudios que evaluaron la neurotoxicidad reversible (HSP70, vacuolización) sí encontraron efectos protectores del haloperidol frente a la injuria inducida por MK801 u otros a-NMDA en la RSC (65, 145, 149, 183).

Estas discrepancias sugieren que existen diferencias cuantitativas y cualitativas entre los mecanismos que provocan el estrés celular reversible respecto de la neurodegeneración. En efecto, lesiones del núcleo colinérgico de Meynert previenen el aumento de HSP70 inducido por MK801 en la RSC pero no la muerte neuronal (209). De modo similar, mientras que tratamientos con estrógenos disminuyen la vacuolización inducida por MK801 (54), estos aumentan la neurodegeneración en ratas macho (46). Finalmente, en un estudio en el que midieron conjuntamente la expresión de HSP70 y la activación de microglia (un marcador indirecto de muerte neuronal) en animales tratados con PCP o KET constataron que el haloperidol anulaba totalmente el HSP70 pero no alteraba la reacción microglial (150). En conjunto, estos estudios indican la relevancia de considerar distintas medidas dentro del espectro neurotóxico y sugieren que los mecanismos que llevan a la muerte neuronal no son idénticos a los responsables de los efectos neurotóxicos reversibles.

Participación de receptores gabaérgicos

Una observación importante de los estudios realizados es que distintas poblaciones neuronales presentan mecanismos de muerte neuronal diferentes. Este hecho instó a focalizar los estudios en la RSC realizando administraciones locales (de los fármacos moduladores de los receptores estudiados) que por un lado proveen especificidad anatómica y, por otro, evitan o disminuyen posibles interacciones farmacocinéticas con el antagonista NMDA (administrado en forma sistémica). De esta manera se obtiene mayor certeza de que los efectos protectores se deben a la acción en los receptores cerebrales modulados más que a la disminución en la biodisponibilidad del MK801.

El efecto protector encontrado con administraciones locales de muscimol demuestra que el agonismo GABA-A en la propia RSC es suficiente para prevenir el efecto neurodegenerativo del MK801. Tal comprobación parece refutar hipótesis previas que sitúan el rol de los receptores GABA-A fundamentalmente en áreas que proyectan a la RSC (63, 164). De todas maneras, puesto que no es posible realizar inyecciones específicas, a escala celular o de capas corticales, no se puede determinar si los receptores que median la protección se localizan en las propias neuronas vulnerables o

se sitúan en terminales excitatórias que hacen sinapsis con las vulnerables, las cuales pueden provenir de la propia RSC o de estructuras aferentes. Ciertamente, ambas posibilidades pueden coexistir además de que otros circuitos más complejos también podrían explicar el efecto protector del muscimol.

Un resultado interesante fue que aún pasadas 10 horas de una intoxicación aguda con MK801 es posible disminuir la muerte neuronal estimulando los receptores inhibitorios GABA-A. Este dato concuerda con estudios que utilizaron un antagonista NMDA gaseoso (óxido nítrico) en los que se requirió un mínimo de ocho horas de inhalación continua para provocar muerte neuronal en la RSC (102). En conjunto, estas evidencias indican que las alteraciones que induce el MK801 que llevan a la muerte celular deben durar al menos diez horas (aprox.) para producir daño cerebral irreversible.

El efecto protector de muscimol y tiopental, en acuerdo con los modelos propuestos para explicar otros efectos de los a-NMDA (164, 185), sugieren que el MK801 inhibe neuronas gabaérgicas y que la consecuente disminución de actividad inhibitoria a través del receptor GABA-A contribuye a la muerte. Sin embargo, el muscimol podría ejercer protección por su efecto inhibitorio sin que esto implique que se está restaurando una alteración inducida por el MK801 en el sistema gabaérgico. En otras palabras: ¿el muscimol protege porque revierte una pérdida de inhibición gabaérgica inducida indirectamente por MK801 o es que las neuronas vulnerables tienen alta densidad de receptores GABA-A y su activación contrarresta el estado excitotóxico que se genera en la RSC?

El primer indicio de que la falta de inhibición gabaérgica no es suficiente para inducir muerte neuronal en la RSC fue provisto por el experimento en el que se administró en la RSC el antagonista GABA-A picrotoxina, la cual no indujo ningún signo de neurodegeneración a pesar de utilizarse dosis que en otras estructuras inducen extensa muerte neuronal (201). Más aún, la administración de picrotoxina en la RSC de animales intoxicados con MK801 no aumentó la neurodegeneración inducida por el a-NMDA, reforzando la noción de que la inhibición GABA-A no participa en la muerte de las neuronas. Así, la protección observada con agonistas GABA-A estaría mediada por su acción hiperpolarizante que alejaría a las neuronas vulnerables del umbral excitotóxico.

Esta interpretación se refuerza con los datos obtenidos con HPLC que no revelaron alteraciones en los niveles del neurotransmisor GABA en los animales tratados con MK801. En contraste, los niveles de glutamato sí mostraron una reducción significativa del 16 % en la RSC ocho horas después de la administración con MK801. Una de las posibles interpretaciones es que la reducción en los niveles del neurotransmisor obedece a una depleción parcial como resultado de un exceso de liberación inducida por el MK801 en horas previas a la medición. Por ejemplo, en modelos experimentales de isquemia-hipoxia el incremento en la liberación de glutamato fue

seguido por una depleción significativa del neurotransmisor en tiempos más tardíos (9, 14, 157). Sea cual fuere el caso, los datos indican que el sistema glutamatérgico es alterado por la droga, en concordancia con resultados obtenidos con PCP y KET en otras estructuras cerebrales (140, 216). Consecuentemente, los siguientes experimentos se orientaron a determinar si los receptores glutamatérgicos intervienen en el mecanismo neurodegenerativo del MK801.

Participación de receptores glutamatérgicos

Debido a que el MK801 es un antagonista NMDA, los primeros candidatos lógicos que podrían mediar efectos excitotóxicos eran los receptores AMPA/KA. Así, se realizaron distintos ensayos utilizando DNQX, un antagonista de los receptores AMPA/KA. Los resultados mostraron una robusta protección de la muerte neuronal aún cuando el antagonista fue administrado 10 horas después del MK801. Tales resultados sugieren que la sobreactivación de receptores AMPA/KA es un factor clave en la neurodegeneración inducida por a-NMDA en la RSC y que probablemente se requiere una sobre-estimulación de al menos 10 horas para que sea letal para las neuronas.

En concordancia con estos datos *in vivo* están los resultados de experimentos en cultivos neuronales que evaluaron la muerte neuronal inducida por agonistas selectivos de los distintos receptores glutamatérgicos. A diferencia de la eficacia de la estimulación NMDA, que con sólo 5 minutos de exposición en el medio de cultivo indujo muerte masiva; la muerte por estimulación selectiva AMPA o KA requirió tiempos de incubación mucho más prolongados (115). Correlativamente, en paradigmas *in vivo* con fármacos convulsivantes (8) se observó que el rescate neuronal con antagonistas NMDA ocurre a tiempos próximos a la injuria neurotóxica (dentro de las dos horas) mientras que en los experimentos de la presente Tesis se encontró protección con DNQX y NASPM hasta diez horas después de iniciado el proceso tóxico. En conjunto, los datos refuerzan la idea de que la degeneración del MK801 es mediada por receptores AMPA/KA.

Existen evidencias en otros modelos experimentales de neuropatología (isquemia, epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, trauma cerebral) de que la neurodegeneración mediada por AMPA/KA es causada por una subpoblación de dichos receptores que son permeables al calcio (12, 118, 119, 155). Los experimentos con NASPM, un bloqueante selectivo para estos receptores, permitió especificar que parte de la degeneración observada tras las administraciones sistémicas de MK801 obedece a la activación de receptores AMPA/KA permeables al calcio. El hecho de que la protección con NASPM fuera del 35-45 % mientras que con DNQX es del 80 % sugiere que no son

exclusivamente los AMPA/KA permeables al calcio los que median la degeneración, involucrando también a los permeables al sodio.

Es importante resaltar que hubo una dependencia temporal del efecto protector el cual no se observó cuando el NASPM fue inyectado 30 minutos después del MK801 mientras que sí a las 5 horas y en mayor medida a las 10 horas. Este efecto tiempo-dependiente del NASPM sugiere que durante la intoxicación con MK801 se producen cambios en la conformación de receptores AMPA/KA de la RSC tornándolos permeables al calcio y, con ello, más proclives a la excitotoxicidad. Dichos cambios podrían involucrar la internalización de la subunidad GLUR2 que es la que le confiere impermeabilidad a los cationes de calcio cuando está presente en la asamblea del receptor (116). Este fenómeno ha sido demostrado en otras condiciones patológicas en las que luego del insulto tóxico la subunidad GLUR2 se retira de la sinapsis y aumenta la permeabilidad al calcio. Es en ese momento cuando la administración de NASPM comienza a mostrar efectos neuroprotectores (12, 118, 120, 155).

Existe una amplia bibliografía indicando que el zinc es co-liberado con el glutamato (166) y que puede ser un mediador de efectos neurodegenerativos (50, 191, 218). Al respecto, los receptores AMPA/KA permeables al calcio son también altamente permeables al zinc convirtiéndose en una vía para el incremento intracelular de este catión y la consecuente toxicidad (23, 214). Basados en ello, se utilizó CaEDTA, un quelante selectivo del zinc que, al no atravesar las membranas, anula específicamente el zinc del intersticio neuronal y no el presente en el interior de las células que participa en muchos procesos enzimáticos normales (166). A pesar de los antecedentes bibliográficos, en este trabajo la administración de CaEDTA a distintos tiempos post-administración del MK801 no alteró los niveles de muerte neuronal sugiriendo que el zinc no es relevante para los efectos degenerativos de esta droga.

Teniendo presente que en numerosos paradigmas de neurotoxicología experimental los efectos degenerativos inducidos por glutamato están mediados a través del receptor NMDA (5, 125) se exploró también esta posibilidad suministrando el MK801 conjuntamente por vía intraperitoneal y local (en la RSC) a distintos tiempos de iniciada la intoxicación sistémica con la droga. Las hipótesis subyacentes eran que, 1) no todos los receptores NMDA de la RSC se bloquean tras la administración sistémica por lo que el glutamato podría allí ejercer un efecto neurotóxico a través de los receptores NMDA libres del MK801; y/o 2) con el transcurrir de las horas, luego de la administración i.p. de MK801, este se elimina más rápidamente en la RSC que en otras estructuras, de manera que el aumento del glutamato (mantenido por la acción del MK801 en estructuras que proyectan a la RSC y que se liberan del MK801 más lentamente) actuaría también a través de receptores NMDA; y/o 3) el bloqueo NMDA induce, como efecto rebote, una elevación del número de receptores NMDA que tornan a la célula vulnerable a las

concentraciones de glutamato normales cuando el fármaco comienza a eliminarse del cerebro. Esto último ha sido observado con el alcohol etílico, el cual también es un inhibidor de receptores NMDA, que durante la intoxicación provoca una sensibilización de receptores NMDA que se manifiesta cuando el alcohol es eliminado del organismo, desatando el síndrome de abstinencia y la neurotoxicidad (90, 91). De hecho la administración de a-NMDA durante esta fase previene el daño neuronal y otros signos del síndrome de abstinencia (15, 147, 197).

En este trabajo, la administración intra-RSC del MK801 tuvo un efecto protector a las 5 horas post-administración, implicando que los receptores NMDA también contribuyen a la neurodegeneración inducida por la dizocilpina. La dependencia temporal del efecto sugiere que hay cambios en los receptores (internalización, desensibilización) que previenen que las inyecciones más tardías tengan consecuencias. La falta de efecto con las administraciones tanto a las 10 como a las 24 horas alejan la posibilidad de que un efecto rebote, como ser la elevación del número de receptores NMDA, contribuya a la muerte. Finalmente, el hecho de que a ningún tiempo halla un aumento de la muerte neuronal implica que las acciones del MK801 que conducen a la neurodegeneración con el suministro sistémico ocurren fuera de la RSC y/o que requieren de la contribución de otras estructuras que interactúan con esta corteza. Esta interpretación es coincidente con los datos obtenidos con administraciones intra-RSC de MK801 y la posterior ausencia de vacuolas (69) o neuronas HSP70 positivas (200), fenómenos histopatológicos que son consistentemente inducidos con las administraciones sistémicas de a-NMDA.

De los datos mencionados hasta ahora emerge el modelo explicativo en el que un estado excitotóxico inducido por desinhibición de vías glutamatérgicas (probablemente originadas fuera de la RSC) conduce, principalmente, a una sobre-estimulación de receptores AMPA/KA que con una duración umbral (aproximadamente 10 horas) provoca daño neuronal irreversible (Figura 22). Si tal fuera el caso, la aplicación de agonistas de receptores AMPA/KA debería emular los efectos neurodegenerativos inducidos por las administraciones sistémicas de MK801. Microinyecciones de AMPA en la RSC lograron remedar varios aspectos de la degeneración por el MK801 por cuanto provocaron muerte neuronal en las capas IV y Va, respetando las capas II y III, e indujeron densas terminales degeneradas en la capa I. Sin embargo, las capas profundas (Vb y VI) también presentaron neurodegeneración mientras que con el MK801 esas capas nunca se vieron afectadas. Mayor similitud se observó en los casos tratados con ácido kaínico porque presentaron muerte somática sólo en las capas IV y Va respetando las capas II y III, Vb y VI, tal como lo hace el MK801.

En principio esto parecería sugerir que el fenómeno estaría comandado principalmente por los receptores KA mientras que los experimentos de protección con antagonistas indican que los receptores AMPA y, en menor medida los NMDA, también

están involucrados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que quizás la mayor emulación del ácido kaínico acontezca porque los receptores kainato se localizan tanto a nivel pre como postsináptico en terminales glutamatérgicas (94, 206). De esta manera, la estimulación de receptores KA induce la liberación de glutamato reclutando la activación de los otros receptores glutamatérgicos. Además, la selectividad del ácido kaínico por los receptores KA no es absoluta y es también un potente agonista directo de receptores AMPA (94, 206).

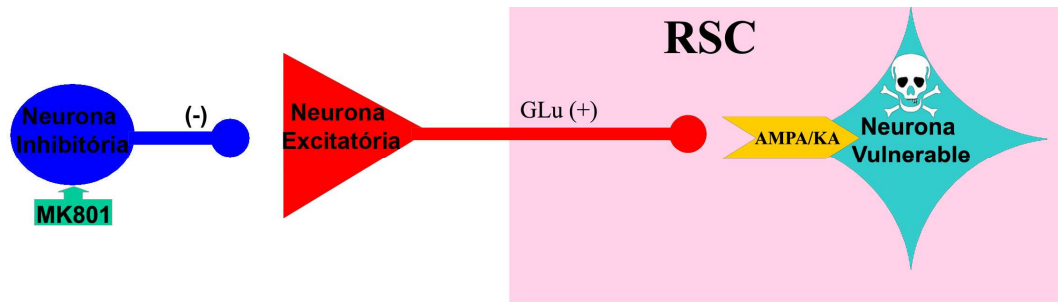


Fig. 22: Modelo de interacción patológica entre neuronas que podría explicar al efecto neurodegenerativo inducido por MK801. El antagonista NMDA bloquea receptores NMDA en neuronas inhibitorias (probablemente gabaérgicas) ubicadas fuera de la corteza retrosplenial que controlan neuronas glutamatérgicas que sinaptan en las neuronas vulnerables de la corteza retrosplenial. El MK801 al bloquear receptores NMDA de las neuronas inhibitorias generaría una pérdida de inhibición de la neurona glutamatérgica generando que la misma incremente la liberación de glutamato de manera sostenida induciendo una estimulación persistente de receptores AMPA/KA que, llegada a un tiempo umbral (aproximadamente de 10 horas), se torna neurodegenerativa.

Posibles mecanismos intracelulares que mediarían la muerte neuronal inducida por estimulación AMPA/KA en la RSC

Aunque la activación AMPA/KA en las membranas celulares sería el gatillador de la neurodegeneración inducida por MK801, la secuencia de eventos intracelulares desatadas por esta sobre-estimulación es desconocida. Habiéndose descartado la posibilidad de una sobrecarga de zinc, es probable que el desbalance intracelular de calcio sea uno de los factores claves. Una gran cantidad de trabajos han demostrado que la elevación intracelular de este catión es el factor crítico del daño celular inducido por procesos excitotóxicos (132, 136). Por ejemplo, en experimentos *in vitro* la degeneración mediada por AMPA es prevenida si se elimina el calcio del medio de cultivo (79).

En el modelo experimental aquí estudiado, la sobrecarga de calcio podría acontecer por la subpoblación de receptores AMPA/KA permeables al calcio, que en ciertos momentos del proceso tóxico parecen ser vías importantes de la toxicidad del MK801. Pero la activación prolongada de los AMPA/KA permeables al sodio es también una vía indirecta para la sobrecarga de calcio, ya que estos, al despolarizar la membrana, abrirían

los canales de calcio dependientes de voltaje (116). Estas presunciones están parcialmente avaladas por estudios que muestran que el estrés celular reversible inducido por MK801 es evitado tanto por bloqueantes de canales de sodio (68) como por bloqueantes de canales de calcio tipo L, los cuales son sensibles a la despolarización neuronal (183).

El calcio intracelular actúa como segundo mensajero activando vías de señalización que pueden contribuir a la muerte celular, como por ejemplo, la activación del factor de transcripción AP-1 (10, 117). Este consiste en una variedad de heterodímeros formados por proteínas de la familia JUN (c-Jun, JunB y JunD) y FOS (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2). La activación de AP-1 es mediada, principalmente, por la fosforilación de la proteína c-Jun por acción de quinasas específicas (187). En este contexto es interesante señalar que hay experimentos que indican que esta vía de señalización es activada por sobre-estimulación de receptores AMPA y que la muerte celular resultante es prevenida si se impide la fosforilación de c-Jun (178). Más importante aún, hay estudios que muestran que las administraciones sistémicas de MK801 incrementan la expresión de c-Jun y otros derivados de AP-1 en las neuronas vulnerables de la RSC (45, 81, 220) y que si se inhibe la síntesis de proteínas con cicloheximida se previene la muerte neuronal (219).

En conjunto, los datos sugieren que la sobrecarga de calcio por estimulación prolongada de receptores AMPA/KA, la activación de AP-1 y el incremento de c-Jun podrían ser parte de los eventos moleculares que desencadenan la muerte de las neuronas retrospleniales.

Por otro lado, el incremento intracelular de calcio ha sido largamente asociado a la alteración del potencial de membrana mitocondrial y la generación de radicales libres que provocan mayor entrada de calcio, estableciéndose un círculo vicioso que se amplifica sucesivamente hasta comprometer la viabilidad de la célula (151, 195). Por ejemplo, la acumulación de calcio puede incapacitar la función mitocondrial haciendo caer los niveles de ATP afectando con ello las defensas antioxidantes de las neuronas. Esto aumenta la concentración citoplasmática de radicales reactivos del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hidroxilo ($\cdot OH$), el superóxido ($\cdot O_2^-$) y el peroxinitrito ($ONOO\cdot$), los cuales destruyen los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Además, hay enzimas activadas por calcio, como la calmodulina que, a su vez, activan la sintasa del óxido nítrico, aumentando los niveles de óxido nítrico el cual, asociado con otros radicales del oxígeno, generan potentes especies reactivas que destruyen las membranas (151, 195).

Concordante con la participación de estos mecanismos como mediadores finales de la muerte celular inducida por α -NMDA, están los estudios de Zou y colaboradores (221) quienes midieron los niveles de $\cdot OH$ en animales tratados con MK801 o KET y encontraron que estos están significativamente aumentados en la RSC de los animales

intoxicados. Más aún, la administración de distintos antioxidantes protege fuertemente contra la muerte neuronal inducida por MK801 (208) o PCP (174).

En síntesis, los experimentos aquí desarrollados junto con la bibliografía permiten conjeturar que la administración de a-NMDA provoca un desbalance en la transmisión glutamatérgica que conlleva a la estimulación prolongada de receptores AMPA/KA con la consecuente entrada de calcio al interior de las neuronas. El incremento de calcio iniciaría cascadas intracelulares, como la activación del complejo AP-1 y la generación de especies reactivas del oxígeno, que conducirían al daño de las organelas hasta comprometer la viabilidad neuronal.

Implicancias de los hallazgos para la salud humana

Aunque éste es un trabajo de investigación básica y como tal apunta principalmente a incrementar el conocimiento, en este caso acerca del mecanismo mediante el cual drogas a-NMDA producen muerte neuronal, es posible hipotetizar sobre potenciales aplicaciones de los datos obtenidos.

La observación de que los agonistas GABA-A fueron efectivos para prevenir la degeneración inducida por MK801 añade una base racional para la asociación de KET y benzodiazepinas en la inducción y/o mantenimiento de la anestesia (53, 188) o la administración posterior de sedantes gabamiméticos para aliviar las reacciones psicomiméticas que pueden emerger durante el periodo post-anestésico (190). Por otra parte, los estudios de ventana temporal de los efectos protectores con agonistas GABA-A son particularmente relevantes en el contexto del abuso de sustancias (i.e. PCP) ya que sugieren que es posible prevenir el daño neuronal aún pasadas varias horas de iniciada la intoxicación. Esto es importante desde que los centros de urgencias reciben a los casos de sobredosis varias horas después de que se produjo la ingesta. Los datos obtenidos sugieren que es valioso implementar estrategias neuroprotectoras aunque la intoxicación ya esté avanzada.

Del mismo modo, los resultados obtenidos con antagonistas AMPA/KA implican que estos fármacos podrían ser igualmente útiles para prevenir la neurodegeneración inducida por a-NMDA, aunque se trataría de una terapéutica escasamente avalada por la investigación clínica. La ventaja de la administración de antagonistas AMPA/KA en situaciones de sobredosis no sería despreciable, ya que los gabamiméticos por su acción sedante o tranquilizante podrían hacer sinergia con el a-NMDA y comprometer las funciones vitales del individuo afectado. Las quinoxalindionas, como el DNQX, (sintetizadas en 1988) fueron los primeros antagonistas AMPA/KA selectivos pero su baja solubilidad en agua y escasa capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica

limitan su potencial aplicación en humanos. Sin embargo, se han desarrollado varias moléculas derivadas de la quinoxalindionas que tienen mejores perfiles para la utilización terapéutica y están siendo empleadas en ensayos clínicos para algunas enfermedades neurológicas (28, 127). Un ejemplo es el talampanel que presenta buena tolerabilidad y se encuentra en fase 2 de ensayos clínicos para su utilización terapéutica contra gliomas malignos (93) y para la esclerosis lateral amiotrófica (167).

Por otro lado, debe señalarse que los agonistas GABA-A y los antagonistas AMPA/KA resultaron protectores contra la toxicidad del MK801 en la RSC pero fueron ineficaces para detener la neurodegeneración en el PLCo, de manera que otras estrategias complementarias (e.g. antagonistas dopaminérgicos) serían necesarias para mejorar la terapia neuroprotectora contra la neurotoxicidad inducida por α -NMDA. Este hecho pone en evidencia la importancia de que los estudios de neuroprotección evalúen todas las estructuras afectadas por un tóxico y no sólo las más sensibles.

En el campo de la psiquiatría biológica es cada vez más aceptado que una hipofunción de los receptores NMDA es un componente importante de la fisiopatología de la esquizofrenia (11, 27, 96, 164). Si consentimos que la administración de MK801 en ratas modela en algún grado esa disfunción, tal como lo indican decenas de investigaciones (19, 99), entonces los mecanismos neurodegenerativos del MK801 en la RSC podrían también ser operativos en la psicosis. Así, los datos obtenidos indican que una sobre-estimulación tónica de receptores AMPA/KA podría ser una causa de las alteraciones neuropatológicas de la RSC y otras áreas observadas en esquizofrénicos. Al respecto, se ha reportado que los niveles de receptores AMPA/KA están reducidos en pacientes esquizofrénicos existiendo la posibilidad de que esta sea una respuesta compensatoria ante una sobre-estimulación de estos receptores glutamatérgicos (135, 154, 172). Consecuentemente, la administración de antagonistas AMPA/KA podría ser un blanco terapéutico.

Por otro lado, la falta de efecto neuroprotector de haloperidol en la RSC, el cual es un antipsicótico de amplia utilización para el tratamiento de la psicosis, sugiere que este no sería adecuado para paliar los cambios neuropatológicos presentes en este desorden. Esto puede explicar el hecho de que los antipsicóticos típicos (como el haloperidol) se han mostrado incapaces para detener el deterioro cognitivo de los enfermos (189) y señalan la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos. En este contexto es interesante señalar que la RSC exhibe volúmenes menores en sujetos con esquizofrenia y que esta disminución se correlaciona con un desempeño neurocognitivo bajo que caracteriza a una subpoblación de esquizofrénicos (138, 139).

Los datos de esta Tesis sugieren que drogas que actúen sobre receptores GABA-A y/o AMPA/KA podrían ser beneficiosas. Al respecto, recientes ensayos clínicos con topiramato -el cual es un potenciador de la transmisión gabaérgica y un antagonista

AMPA/KA utilizado en el tratamiento de la epilepsia- mostraron ser efectivos para aminorar los síntomas (tanto positivos como negativos) de pacientes esquizofrénicos (2, 198).

Las limitaciones de estas especulaciones son claras y quedan ilustradas por otro hallazgo obtenido en esta tesis: si los ratones presentan notables diferencias respecto de las ratas en los efectos neurodegenerativos inducidos por MK801, ¿Cuánto más podemos esperar si lo que intentamos es extrapolar estos resultados al hombre?... No obstante, la experiencia demuestra que la utilización de modelos animales es una pieza fundamental para el progreso de la biomedicina.

Capítulo 5
BIBLIOGRAFÍA

1. **Aalto S, Ihalainen J, Hirvonen J, Kajander J, Scheinin H, Tanila H, Nagren K, Vilkmann H, Gustafsson LL, Syvalahti E, and Hietala J.** Cortical glutamate-dopamine interaction and ketamine-induced psychotic symptoms in man. *Psychopharmacology (Berl)* 182: 375-383, 2005.
2. **Afshar H, Roohafza H, Mousavi G, Golchin S, Toghianifar N, Sadeghi M, and Taleai M.** Topiramate add-on treatment in schizophrenia: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Psychopharmacol* 23: 157-162, 2009.
3. **Alagarsamy S, Phillips M, Pappas T, and Johnson KM.** Dopamine neurotoxicity in cortical neurons. *Drug Alcohol Depend* 48: 105-111, 1997.
4. **Arif M, Chikuma T, Ahmed MM, Yoshida S, and Kato T.** Suppressive effect of clozapine but not haloperidol on the increases of neuropeptide-degrading enzymes and glial cells in MK-801-treated rat brain regions. *Neurosci Res* 57: 248-258, 2007.
5. **Arundine M, and Tymianski M.** Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61: 657-668, 2004.
6. **Ashe PC, Berry MD, and Boulton AA.** Schizophrenia, a neurodegenerative disorder with neurodevelopmental antecedents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25: 691-707, 2001.
7. **Auer RN.** Effect of age and sex on N-methyl-D-aspartate antagonist-induced neuronal necrosis in rats. *Stroke* 27: 743-746, 1996.
8. **Ayala GX, and Tapia R.** Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neurons from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *Eur J Neurosci* 22: 3067-3076, 2005.
9. **Back SA, Craig A, Kayton RJ, Luo NL, Meshul CK, Allcock N, and Fern R.** Hypoxia-ischemia preferentially triggers glutamate depletion from oligodendroglia and axons in perinatal cerebral white matter. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 334-347, 2007.
10. **Behrens A, Sibilio M, and Wagner EF.** Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21: 326-329, 1999.
11. **Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, Quinlan EM, and Nakazawa K.** Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci* 13: 76-83.
12. **Bell JD, Ai J, Chen Y, and Baker AJ.** Mild in vitro trauma induces rapid Glur2 endocytosis, robustly augments calcium permeability and enhances susceptibility to secondary excitotoxic insult in cultured Purkinje cells. *Brain* 130: 2528-2542, 2007.
13. **Benkovic SA, O'Callaghan JP, and Miller DB.** Sensitive indicators of injury reveal hippocampal damage in C57BL/6J mice treated with kainic acid in the absence of tonic-clonic seizures. *Brain Res* 1024: 59-76, 2004.
14. **Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, and Diemer NH.** Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43: 1369-1374, 1984.
15. **Bienkowski P, Krzascik P, Koros E, Kostowski W, Scinska A, and Danysz W.** Effects of a novel uncompetitive NMDA receptor antagonist, MRZ 2/579 on ethanol self-administration and ethanol withdrawal seizures in the rat. *Eur J Pharmacol* 413: 81-89, 2001.
16. **Bisaga A, and Popik P.** In search of a new pharmacological treatment for drug and alcohol addiction: N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists. *Drug Alcohol Depend* 59: 1-15, 2000.
17. **Bormann J.** The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21: 16-19, 2000.
18. **Bowyer JF, Delongchamp RR, and Jakab RL.** Glutamate N-methyl-D-aspartate and dopamine receptors have contrasting effects on the limbic versus the somatosensory cortex with respect to amphetamine-induced neurodegeneration. *Brain Res* 1030: 234-246, 2004.

19. **Breese GR, Knapp DJ, and Moy SS.** Integrative role for serotonergic and glutamatergic receptor mechanisms in the action of NMDA antagonists: potential relationships to antipsychotic drug actions on NMDA antagonist responsiveness. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 441-455, 2002.
20. **Brosnan-Watters G, Ogimi T, Ford D, Tatekawa L, Gilliam D, Bilsky EJ, and Nash D.** Differential effects of MK-801 on cerebrocortical neuronal injury in C57BL/6J, NSA, and ICR mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24: 925-938, 2000.
21. **Bueno A, De Olmos S, Heimer L, and De Olmos J.** NMDA-antagonist MK-801-induced neuronal degeneration in Wistar rat brain detected by the Amino-Cupric-Silver method. *Exp Toxicol Pathol* 54: 319-334, 2003.
22. **Bueno A, de Olmos S, Manzini F, Desmond NL, and de Olmos J.** Strain and colony differences in the neurotoxic sequelae of MK-801 visualized with the amino-cupric-silver method. *Exp Toxicol Pathol* 55: 287-294, 2003.
23. **Calderone A, Jover T, Mashiko T, Noh KM, Tanaka H, Bennett MV, and Zukin RS.** Late calcium EDTA rescues hippocampal CA1 neurons from global ischemia-induced death. *J Neurosci* 24: 9903-9913, 2004.
24. **Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, and Vernier P.** Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95: 489-502, 2003.
25. **Camara-Lemarroy CR, Guzman-de la Garza FJ, Alarcon-Galvan G, Cordero-Perez P, and Fernandez-Garza NE.** The effects of NMDA receptor antagonists over intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 621: 78-85, 2009.
26. **Carlin AS, Grant I, Adams KM, and Reed R.** Is phencyclidine (PCP) abuse associated with organic mental impairment? *Am J Drug Alcohol Abuse* 6: 273-281, 1979.
27. **Carlsson A, Hansson LO, Waters N, and Carlsson ML.** A glutamatergic deficiency model of schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* 2-6, 1999.
28. **Catarzi D, Colotta V, and Varano F.** Competitive AMPA receptor antagonists. *Med Res Rev* 27: 239-278, 2007.
29. **Caudle WM, and Zhang J.** Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Exp Neurol* 220: 230-233, 2009.
30. **Colbourne F, Rakic D, and Auer RN.** The effects of temperature and scopolamine on N-methyl-D-aspartate antagonist-induced neuronal necrosis in the rat. *Neuroscience* 90: 87-94, 1999.
31. **Corso TD, Mostafa HM, Collins MA, and Neafsey EJ.** Brain neuronal degeneration caused by episodic alcohol intoxication in rats: effects of nimodipine, 6,7-dinitro-quinoxaline-2,3-dione, and MK-801. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 217-224, 1998.
32. **Corso TD, Sesma MA, Tenkova TI, Der TC, Wozniak DF, Farber NB, and Olney JW.** Multifocal brain damage induced by phencyclidine is augmented by pilocarpine. *Brain Res* 752: 1-14, 1997.
33. **Cosgrove J, and Newell TG.** Recovery of neuropsychological functions during reduction in use of phencyclidine. *J Clin Psychol* 47: 159-169, 1991.
34. **Coyle JT, and Tsai G.** NMDA receptor function, neuroplasticity, and the pathophysiology of schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 59: 491-515, 2004.
35. **Creeley CE, Wozniak DF, Nardi A, Farber NB, and Olney JW.** Donepezil markedly potentiates memantine neurotoxicity in the adult rat brain. *Neurobiol Aging* 29: 153-167, 2008.
36. **Csernansky JG.** Neurodegeneration in schizophrenia: evidence from in vivo neuroimaging studies. *Scientific World Journal* 7: 135-143, 2007.

37. **Curran HV, and Monaghan L.** In and out of the K-hole: a comparison of the acute and residual effects of ketamine in frequent and infrequent ketamine users. *Addiction* 96: 749-760, 2001.
38. **Curran HV, and Morgan C.** Cognitive, dissociative and psychotogenic effects of ketamine in recreational users on the night of drug use and 3 days later. *Addiction* 95: 575-590, 2000.
39. **Chen J, Rusnak M, Luedtke RR, and Sidhu A.** D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J Biol Chem* 279: 39317-39330, 2004.
40. **Chen SR, Samoriski G, and Pan HL.** Antinociceptive effects of chronic administration of uncompetitive NMDA receptor antagonists in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Neuropharmacology* 57: 121-126, 2009.
41. **Chen WJF, T.C.; Ting, T.T.; Huang, W.L.; Tang, G.M.; Hsiao, C.K.; Chen, C.Y.** Use of ecstasy and other psychoactive substances among school-attending adolescents in Taiwan: national surveys 2004-2006. *BMC Public Health* 21: 9:27, 2009.
42. **Chizh BA.** Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. *J Psychopharmacol* 21: 259-271, 2007.
43. **D'Onofrio G, McCausland JB, Tarabar AF, and Degutis LC.** Illy: clinical and public health implications of a street drug. *Subst Abus* 27: 45-51, 2006.
44. **de Olmos JS, Beltramino CA, and de Olmos de Lorenzo S.** Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and physical trauma. *Neurotoxicol Teratol* 16: 545-561, 1994.
45. **de Olmos S, Bender C, de Olmos JS, and Lorenzo A.** Neurodegeneration and prolonged immediate early gene expression throughout cortical areas of the rat brain following acute administration of dizocilpine. *Neuroscience* 164: 1347-1359, 2009.
46. **de Olmos S, Bueno A, Bender C, Lorenzo A, and de Olmos J.** Sex differences and influence of gonadal hormones on MK801-induced neuronal degeneration in the granular retrosplenial cortex of the rat. *Brain Struct Funct* 213: 229-238, 2008.
47. **Deng X, Ladenheim B, Jayanthi S, and Cadet JL.** Methamphetamine administration causes death of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *Biol Psychiatry* 61: 1235-1243, 2007.
48. **Deutsch SI, Rosse RB, Schwartz BL, and Mastropaolo J.** A revised excitotoxic hypothesis of schizophrenia: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol* 24: 43-49, 2001.
49. **Dickerson J, and Sharp FR.** Atypical antipsychotics and a Src kinase inhibitor (PP1) prevent cortical injury produced by the psychomimetic, noncompetitive NMDA receptor antagonist MK-801. *Neuropsychopharmacology* 31: 1420-1430, 2006.
50. **Dineley KE, Votyakova TV, and Reynolds IJ.** Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. *J Neurochem* 85: 563-570, 2003.
51. **Domini G.** Detienen en Pinamar a una banda que vendía Ketamina. Es un anestésico para caballos. Lo distribuían en fiestas electrónicas [en línea]. *Clarín.com* 27 de Enero de 2010 [Consultado en febrero de 2010] Disponible en la URL <http://www.clarin.com/diario/2010/01/27/policiales/g-02128049htm> 2010.
52. **Domino EF, Chodoff P, and Corssen G.** Pharmacologic Effects of Ci-581, a New Dissociative Anesthetic, in Man. *Clin Pharmacol Ther* 6: 279-291, 1965.
53. **Domino EF, Domino SE, Smith RE, Domino LE, Goulet JR, Domino KE, and Zsigmond EK.** Ketamine kinetics in unmedicated and diazepam-premedicated subjects. *Clin Pharmacol Ther* 36: 645-653, 1984.

54. **Dribben W, Nemmers B, Nardi A, Taylor G, Olney J, and Farber N.** Chronic but not acute estradiol treatment protects against the neurodegenerative effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Endocrine* 21: 53-58, 2003.
55. **Duncan GE, Leipzig JN, Mailman RB, and Lieberman JA.** Differential effects of clozapine and haloperidol on ketamine-induced brain metabolic activation. *Brain Res* 812: 65-75, 1998.
56. **Duncan GE, Miyamoto S, Leipzig JN, and Lieberman JA.** Comparison of brain metabolic activity patterns induced by ketamine, MK-801 and amphetamine in rats: support for NMDA receptor involvement in responses to subanesthetic dose of ketamine. *Brain Res* 843: 171-183, 1999.
57. **Ellison G.** Competitive and non-competitive NMDA antagonists induce similar limbic degeneration. *Neuroreport* 5: 2688-2692, 1994.
58. **Ellison G.** The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 250-267, 1995.
59. **Ellison G, and Switzer RC, 3rd.** Dissimilar patterns of degeneration in brain following four different addictive stimulants. *Neuroreport* 5: 17-20, 1993.
60. **Enomoto T, Noda Y, Mouri A, Shin EJ, Wang D, Murai R, Hotta K, Furukawa H, Nitta A, Kim HC, and Nabeshima T.** Long-lasting impairment of associative learning is correlated with a dysfunction of N-methyl-D-aspartate-extracellular signaling-regulated kinase signaling in mice after withdrawal from repeated administration of phencyclidine. *Mol Pharmacol* 68: 1765-1774, 2005.
61. **Escotoado A.** Historia general de las drogas: capitulo I: magia, farmacia y religión. Séptima Edición. *Madrid, Editorial Alianza Séptima Edición:* 21:36, 1998.
62. **Fallon J, Loughlin SE.** The rat nervous system: chapter 12: Substantia Nigra. *Second Edition, Australia, editor George Paxinos (Academic Press)* 215:237, 1995.
63. **Farber NB.** The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 119-130, 2003.
64. **Farber NB, Foster J, Duhan NL, and Olney JW.** alpha 2 adrenergic agonists prevent MK-801 neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology* 12: 347-349, 1995.
65. **Farber NB, Foster J, Duhan NL, and Olney JW.** Olanzapine and fluperlapine mimic clozapine in preventing MK-801 neurotoxicity. *Schizophr Res* 21: 33-37, 1996.
66. **Farber NB, Hanslick J, Kirby C, McWilliams L, and Olney JW.** Serotonergic agents that activate 5HT2A receptors prevent NMDA antagonist neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology* 18: 57-62, 1998.
67. **Farber NB, Jiang X, Dikranian K, and Nemmers B.** Muscimol prevents NMDA antagonist neurotoxicity by activating GABAA receptors in several brain regions. *Brain Res* 993: 90-100, 2003.
68. **Farber NB, Jiang XP, Heinkel C, and Nemmers B.** Antiepileptic drugs and agents that inhibit voltage-gated sodium channels prevent NMDA antagonist neurotoxicity. *Mol Psychiatry* 7: 726-733, 2002.
69. **Farber NB, Kim SH, Dikranian K, Jiang XP, and Heinkel C.** Receptor mechanisms and circuitry underlying NMDA antagonist neurotoxicity. *Mol Psychiatry* 7: 32-43, 2002.
70. **Fatemi SH, and Folsom TD.** The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull* 35: 528-548, 2009.
71. **Fiske BK, and Brunjes PC.** NMDA receptor regulation of cell death in the rat olfactory bulb. *J Neurobiol* 47: 223-232, 2001.

72. **Fix AS, Horn JW, Wightman KA, Johnson CA, Long GG, Storts RW, Farber N, Wozniak DF, and Olney JW.** Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)-801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Exp Neurol* 123: 204-215, 1993.
73. **Fix AS, Ross JF, Stitzel SR, and Switzer RC.** Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol Pathol* 24: 291-304, 1996.
74. **Fix AS, Stitzel SR, Ridder GM, and Switzer RC.** MK-801 neurotoxicity in cupric silver-stained sections: lesion reconstruction by 3-dimensional computer image analysis. *Toxicol Pathol* 28: 84-90, 2000.
75. **Fix AS, Wightman KA, and O'Callaghan JP.** Reactive gliosis induced by MK-801 in the rat posterior cingulate/retrosplenial cortex: GFAP evaluation by sandwich ELISA and immunocytochemistry. *Neurotoxicology* 16: 229-237, 1995.
76. **Fix AS, Wozniak DF, Truex LL, McEwen M, Miller JP, and Olney JW.** Quantitative analysis of factors influencing neuronal necrosis induced by MK-801 in the rat posterior cingulate/retrosplenial cortex. *Brain Res* 696: 194-204, 1995.
77. **Fowler JH, McCracken E, Dewar D, and McCulloch J.** Intracerebral injection of AMPA causes axonal damage in vivo. *Brain Res* 991: 104-112, 2003.
78. **Fujimura M, Hashimoto K, and Yamagami K.** Effects of antipsychotic drugs on neurotoxicity, expression of fos-like protein and c-fos mRNA in the retrosplenial cortex after administration of dizocilpine. *Eur J Pharmacol* 398: 1-10, 2000.
79. **Garthwaite G, and Garthwaite J.** Mechanisms of AMPA Neurotoxicity in Rat Brain Slices. *Eur J Neurosci* 3: 729-736, 1991.
80. **Gaspar PA, Bustamante ML, Silva H, and Aboitiz F.** Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. *J Neurochem* 111: 891-900, 2009.
81. **Gass P, Herdegen T, Bravo R, and Kiessling M.** Induction and suppression of immediate early genes in specific rat brain regions by the non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Neuroscience* 53: 749-758, 1993.
82. **Giovannini MG, Mutolo D, Bianchi L, Michelassi A, and Pepeu G.** NMDA receptor antagonists decrease GABA outflow from the septum and increase acetylcholine outflow from the hippocampus: a microdialysis study. *J Neurosci* 14: 1358-1365, 1994.
83. **Gould E.** How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8: 481-488, 2007.
84. **Gu X, Li C, Wei W, Lo V, Gong S, Li SH, Iwasato T, Itohara S, Li XJ, Mody I, Heintz N, and Yang XW.** Pathological cell-cell interactions elicited by a neuropathogenic form of mutant Huntingtin contribute to cortical pathogenesis in HD mice. *Neuron* 46: 433-444, 2005.
85. **Gunduz-Bruce H.** The acute effects of NMDA antagonism: from the rodent to the human brain. *Brain Res Rev* 60: 279-286, 2009.
86. **Hashimoto K.** Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* 61: 105-123, 2009.
87. **Hastings TG, Lewis DA, and Zigmond MJ.** Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1956-1961, 1996.
88. **Herculano-Houzel S, Mota B, and Lent R.** Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12138-12143, 2006.

89. **Horvath ZC, Czopf J, and Buzsaki G.** MK-801-induced neuronal damage in rats. *Brain Res* 753: 181-195, 1997.
90. **Hughes JR.** Alcohol withdrawal seizures. *Epilepsy Behav* 15: 92-97, 2009.
91. **Hunt WA.** Are binge drinkers more at risk of developing brain damage? *Alcohol* 10: 559-561, 1993.
92. **Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, and Olney JW.** Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283: 70-74, 1999.
93. **Iwamoto FM, Kreisl TN, Kim L, Duic JP, Butman JA, Albert PS, and Fine HA.** Phase 2 trial of talampanel, a glutamate receptor inhibitor, for adults with recurrent malignant gliomas. *Cancer* 116: 1776-1782.
94. **Jane DE, Lodge D, and Collingridge GL.** Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56: 90-113, 2009.
95. **Jansen KL, and Darracot-Cankovic R.** The nonmedical use of ketamine, part two: A review of problem use and dependence. *J Psychoactive Drugs* 33: 151-158, 2001.
96. **Javitt DC.** Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int Rev Neurobiol* 78: 69-108, 2007.
97. **Jayanthi S, McCoy MT, Beauvais G, Ladenheim B, Gilmore K, Wood W, 3rd, Becker K, and Cadet JL.** Methamphetamine induces dopamine D1 receptor-dependent endoplasmic reticulum stress-related molecular events in the rat striatum. *PLoS One* 4: e6092, 2009.
98. **Jentsch JD, Redmond DE, Jr., Elsworth JD, Taylor JR, Youngren KD, and Roth RH.** Enduring cognitive deficits and cortical dopamine dysfunction in monkeys after long-term administration of phencyclidine. *Science* 277: 953-955, 1997.
99. **Jentsch JD, and Roth RH.** The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20: 201-225, 1999.
100. **Jentsch JD, and Taylor JR.** Impaired inhibition of conditioned responses produced by subchronic administration of phencyclidine to rats. *Neuropsychopharmacology* 24: 66-74, 2001.
101. **Jentsch JD, Tran A, Le D, Youngren KD, and Roth RH.** Subchronic phencyclidine administration reduces mesoprefrontal dopamine utilization and impairs prefrontal cortical-dependent cognition in the rat. *Neuropsychopharmacology* 17: 92-99, 1997.
102. **Jevtovic-Todorovic V, Beals J, Benshoff N, and Olney JW.** Prolonged exposure to inhalational anesthetic nitrous oxide kills neurons in adult rat brain. *Neuroscience* 122: 609-616, 2003.
103. **Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM, Mennerick S, Powell S, Dikranian K, Benshoff N, Zorumski CF, and Olney JW.** Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. *Nat Med* 4: 460-463, 1998.
104. **Jevtovic-Todorovic V, Wozniak DF, Powell S, Nardi A, and Olney JW.** Clonidine potentiates the neuropathic pain-relieving action of MK-801 while preventing its neurotoxic and hyperactivity side effects. *Brain Res* 781: 202-211, 1998.
105. **Jevtovic-Todorovic V, Wozniak DF, Powell S, and Olney JW.** Propofol and sodium thiopental protect against MK-801-induced neuronal necrosis in the posterior cingulate/retrosplenial cortex. *Brain Res* 913: 185-189, 2001.
106. **Johnson KM, Phillips M, Wang C, and Kevetter GA.** Chronic phencyclidine induces behavioral sensitization and apoptotic cell death in the olfactory and piriform cortex. *J Neurosci Res* 52: 709-722, 1998.

107. **Kaindl AM, and Ikonomidou C.** Glutamate antagonists are neurotoxins for the developing brain. *Neurotox Res* 11: 203-218, 2007.
108. **Kalia LV, Kalia SK, and Salter MW.** NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol* 7: 742-755, 2008.
109. **Kandel E.** Neurociencia y conducta: capitulo 13: La integración sináptica. *Primera Edición, Madrid, editor Juan Stumpf (Prentice Hall)* 235:259, 1997.
110. **Kapur S, Wadenberg ML, and Remington G.** Are animal studies of antipsychotics appropriately dosed? Lessons from the bedside to the bench. *Can J Psychiatry* 45: 241-246, 2000.
111. **Kegeles LS, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann JJ, Van Heertum RL, Cooper TB, Carlsson A, and Laruelle M.** Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 48: 627-640, 2000.
112. **Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK, and Low MJ.** Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J Neurosci* 18: 3470-3479, 1998.
113. **Kim SH, Price MT, Olney JW, and Farber NB.** Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by GABAergic and alpha2-adrenergic agonists. *Mol Psychiatry* 4: 344-352, 1999.
114. **Kitt CA, Hohmann C, Coyle JT, and Price DL.** Cholinergic innervation of mouse forebrain structures. *J Comp Neurol* 341: 117-129, 1994.
115. **Koh JY, Goldberg MP, Hartley DM, and Choi DW.** Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J Neurosci* 10: 693-705, 1990.
116. **Konig N, Poluch S, Estabel J, Durand M, Drian MJ, and Exbrayat JM.** Synaptic and non-synaptic AMPA receptors permeable to calcium. *Jpn J Pharmacol* 86: 1-17, 2001.
117. **Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, and Rakic P.** A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15184-15189, 2003.
118. **Kuner R, Groom AJ, Bresink I, Kornau HC, Stefovskaja V, Muller G, Hartmann B, Tschauner K, Waibel S, Ludolph AC, Ikonomidou C, Seeburg PH, and Turski L.** Late-onset motoneuron disease caused by a functionally modified AMPA receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5826-5831, 2005.
119. **Kwak S, and Weiss JH.** Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* 16: 281-287, 2006.
120. **Leonoudakis D, Zhao P, and Beattie EC.** Rapid tumor necrosis factor alpha-induced exocytosis of glutamate receptor 2-lacking AMPA receptors to extrasynaptic plasma membrane potentiates excitotoxicity. *J Neurosci* 28: 2119-2130, 2008.
121. **Li Q, Clark S, Lewis DV, and Wilson WA.** NMDA receptor antagonists disinhibit rat posterior cingulate and retrosplenial cortices: a potential mechanism of neurotoxicity. *J Neurosci* 22: 3070-3080, 2002.
122. **Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, and Grace AA.** Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 31: 234-242, 2008.
123. **Liu H, and Yao S.** Thiopental sodium reduces glutamate extracellular levels in rat intact prefrontal cortex. *Exp Brain Res* 167: 666-669, 2005.

124. **Liu J, and Moghaddam B.** Regulation of glutamate efflux by excitatory amino acid receptors: evidence for tonic inhibitory and phasic excitatory regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 1209-1215, 1995.
125. **Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, and Wang YT.** NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27: 2846-2857, 2007.
126. **Livy DJ, Parnell SE, and West JR.** Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcohol* 29: 165-171, 2003.
127. **Madsen U, Stensbol TB, and Krosgaard-Larsen P.** Inhibitors of AMPA and kainate receptors. *Curr Med Chem* 8: 1291-1301, 2001.
128. **Manahan-Vaughan D, von Haebler D, Winter C, Juckel G, and Heinemann U.** A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats. *Hippocampus* 18: 125-134, 2008.
129. **Mandairon N, Jourdan F, and Didier A.** Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb up-regulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice. *Neuroscience* 119: 507-516, 2003.
130. **Mariani A.** Una droga animal [enlinea]. *LaVozcomar Domingo 13 de enero de 2008 [Consultado en febrero de 2010] Disponible en la URL http://www.lavozcomar/Notaasp?nota_id=152246&high=ketamina 2008.*
131. **Mattson MP.** Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144: 97-112, 2008.
132. **Mattson MP, Rydel RE, Lieberburg I, and Smith-Swintosky VL.** Altered calcium signaling and neuronal injury: stroke and Alzheimer's disease as examples. *Ann N Y Acad Sci* 679: 1-21, 1993.
133. **McCarthy DA, Chen G, Kaump DH, and Ensor C.** General Anesthetic and Other Pharmacological Properties of 2-(O-Chlorophenyl)-2-Methylamino Cyclohexanone Hcl (Ci-58l). *J New Drugs* 28: 21-33, 1965.
134. **McGlashan T.** Is active psychosis neurotoxic?. *Schizophr Bull* 32 609-613, 2006
135. **Meador-Woodruff JH, and Healy DJ.** Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 288-294, 2000.
136. **Meldrum B, and Garthwaite J.** Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 11: 379-387, 1990.
137. **Mitchell IJ, Cooper AJ, Griffiths MR, and Barber DJ.** Phencyclidine and corticosteroids induce apoptosis of a subpopulation of striatal neurons: a neural substrate for psychosis? *Neuroscience* 84: 489-501, 1998.
138. **Mitelman SA, Brickman AM, Shihabuddin L, Newmark RE, Hazlett EA, Haznedar MM, and Buchsbaum MS.** A comprehensive assessment of gray and white matter volumes and their relationship to outcome and severity in schizophrenia. *Neuroimage* 37: 449-462, 2007.
139. **Mitelman SA, Shihabuddin L, Brickman AM, Hazlett EA, and Buchsbaum MS.** Volume of the cingulate and outcome in schizophrenia. *Schizophr Res* 72: 91-108, 2005.
140. **Moghaddam B, Adams B, Verma A, and Daly D.** Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17: 2921-2927, 1997.
141. **Mokhlesi B, Garimella PS, Joffe A, and Velho V.** Street drug abuse leading to critical illness. *Intensive Care Med* 30: 1526-1536, 2004.

142. **Morgan CJ, Monaghan L, and Curran HV.** Beyond the K-hole: a 3-year longitudinal investigation of the cognitive and subjective effects of ketamine in recreational users who have substantially reduced their use of the drug. *Addiction* 99: 1450-1461, 2004.
143. **Morgan CJ, Muetzelfeldt L, and Curran HV.** Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: a 1-year longitudinal study. *Addiction* 105: 121-133, 2009.
144. **Morgan CJ, Muetzelfeldt L, and Curran HV.** Ketamine use, cognition and psychological wellbeing: a comparison of frequent, infrequent and ex-users with polydrug and non-using controls. *Addiction* 104: 77-87, 2009.
145. **Morimoto T, Hashimoto K, Yasumatsu H, Tanaka H, Fujimura M, Kuriyama M, Kimura K, Takehara S, and Yamagami K.** Neuropharmacological profile of a novel potential atypical antipsychotic drug Y-931 (8-fluoro-12-(4-methylpiperazin-1-yl)-6H-[1]benzothieno[2,3-b][1,5]benzodiazepine maleate). *Neuropsychopharmacology* 26: 456-467, 2002.
146. **Nadler JV.** Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 29: 2031-2042, 1981.
147. **Nagy J, Horvath C, Farkas S, Kolok S, and Szombathelyi Z.** NR2B subunit selective NMDA antagonists inhibit neurotoxic effect of alcohol-withdrawal in primary cultures of rat cortical neurones. *Neurochem Int* 44: 17-23, 2004.
148. **Nakahara T, Kuroki T, Hondo H, Tsutsumi T, Fukuda K, Yao H, and Uchimura H.** Effects of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol on expression of heat shock protein in the discrete brain regions of phencyclidine-treated rats. *Brain Res Mol Brain Res* 73: 193-197, 1999.
149. **Nakki R, Koistinaho J, Sharp FR, and Sagar SM.** Cerebellar toxicity of phencyclidine. *J Neurosci* 15: 2097-2108, 1995.
150. **Nakki R, Nickolenko J, Chang J, Sagar SM, and Sharp FR.** Haloperidol prevents ketamine- and phencyclidine-induced HSP70 protein expression but not microglial activation. *Exp Neurol* 137: 234-241, 1996.
151. **Nicholls DG.** Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1147: 53-60, 2008.
152. **NIDA.** Los alucinógenos: Club Drugs (GHB, Ketamine, and Rohypnol) [en línea] *National Institute of Drug Abuse USA 2009 [consultado en diciembre de 2009] Disponible en la URL <<http://www.drugabuse.gov/>>* 2009.
153. **NIDA.** Los alucinógenos: LSD, peyote, psilocibina y PCP [en línea] *InfoFacts National Institute of Drug Abuse 2009 [consultado en diciembre de 2009] Disponible en la URL <<http://www.drugabuse.gov/>>* 2009.
154. **Noga JT, and Wang H.** Further postmortem autoradiographic studies of AMPA receptor binding in schizophrenia. *Synapse* 45: 250-258, 2002.
155. **Noh KM, Yokota H, Mashiko T, Castillo PE, Zukin RS, and Bennett MV.** Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12230-12235, 2005.
156. **Oades RD, and Halliday GM.** Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434: 117-165, 1987.
157. **Obrenovitch TP, and Urenjak J.** Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? *J Neurotrauma* 14: 677-698, 1997.
158. **Olney JW.** Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 15: 259-260, 1994.
159. **Olney JW.** Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 3: 101-109, 2003.

160. **Olney JW.** New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 43: 47-51, 1994.
161. **Olney JW, and Farber NB.** NMDA antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13: 335-345, 1995.
162. **Olney JW, Labruyere J, and Price MT.** Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 244: 1360-1362, 1989.
163. **Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, and Sesma MA.** NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254: 1515-1518, 1991.
164. **Olney JW, Newcomer JW, and Farber NB.** NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 33: 523-533, 1999.
165. **Ozawa S, Kamiya H, and Tsuzuki K.** Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54: 581-618, 1998.
166. **Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, and Casado M.** Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158: 126-136, 2009.
167. **Pascuzzi RM, Shefner J, Chappell AS, Bjerke JS, Tamura R, Chaudhry V, Clawson L, Haas L, and Rothstein JD.** A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 11: 266-271.
168. **Paxinos G, and Watson C.** The rat brain stereotaxic coordinates. *6th ed: Academic press, San Diego, 2007.*
169. **Paxinos GF, and Franklin KB.** The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd Edition, *Academic Press, San Diego, 2001.*
170. **Perez-Neri I, Ramirez-Bermudez J, Montes S, and Rios C.** Possible mechanisms of neurodegeneration in schizophrenia. *Neurochem Res* 31: 1279-1294, 2006.
171. **Picciotto MR, and Wickman K.** Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiol Rev* 78: 1131-1163, 1998.
172. **Porter RH, Eastwood SL, and Harrison PJ.** Distribution of kainate receptor subunit mRNAs in human hippocampus, neocortex and cerebellum, and bilateral reduction of hippocampal GluR6 and KA2 transcripts in schizophrenia. *Brain Res* 751: 217-231, 1997.
173. **Rabinovic AD, Lewis DA, and Hastings TG.** Role of oxidative changes in the degeneration of dopamine terminals after injection of neurotoxic levels of dopamine. *Neuroscience* 101: 67-76, 2000.
174. **Rajdev S, Fix AS, and Sharp FR.** Acute phencyclidine neurotoxicity in rat forebrain: induction of haem oxygenase-1 and attenuation by the antioxidant dimethylthiourea. *Eur J Neurosci* 10: 3840-3852, 1998.
175. **Rajdev S, and Sharp FR.** Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol Pathol* 28: 105-112, 2000.
176. **Retaux S, Besson MJ, and Penit-Soria J.** Opposing effects of dopamine D2 receptor stimulation on the spontaneous and the electrically evoked release of [3H]GABA on rat prefrontal cortex slices. *Neuroscience* 42: 61-71, 1991.
177. **Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, and Grandy DK.** Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90: 991-1001, 1997.

178. **Santos AE, Duarte CB, Iizuka M, Barsoumian EL, Ham J, Lopes MC, Carvalho AP, and Carvalho AL.** Excitotoxicity mediated by Ca²⁺-permeable GluR4-containing AMPA receptors involves the AP-1 transcription factor. *Cell Death Differ* 13: 652-660, 2006.
179. **Sattler R, and Tymianski M.** Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 24: 107-129, 2001.
180. **Savasta M, Dubois A, and Scatton B.** Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390. *Brain Res* 375: 291-301, 1986.
181. **Schmued LC, and Hopkins KJ.** Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874: 123-130, 2000.
182. **Schoppa NE, Kinzie JM, Sahara Y, Segerson TP, and Westbrook GL.** Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. *J Neurosci* 18: 6790-6802, 1998.
183. **Sharp FR, Butman M, Koistinaho J, Aardalen K, Nakki R, Massa SM, Swanson RA, and Sagar SM.** Phencyclidine induction of the hsp 70 stress gene in injured pyramidal neurons is mediated via multiple receptors and voltage gated calcium channels. *Neuroscience* 62: 1079-1092, 1994.
184. **Sharp FR, Butman M, Wang S, Koistinaho J, Graham SH, Sagar SM, Noble L, Berger P, and Longo FM.** Haloperidol prevents induction of the hsp70 heat shock gene in neurons injured by phencyclidine (PCP), MK801, and ketamine. *J Neurosci Res* 33: 605-616, 1992.
185. **Sharp FR, Tomitaka M, Bernaudin M, and Tomitaka S.** Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia? *Trends Neurosci* 24: 330-334, 2001.
186. **Sharp JW, Petersen DL, and Langford MT.** DNQX inhibits phencyclidine (PCP) and ketamine induction of the hsp70 heat shock gene in the rat cingulate and retrosplenial cortex. *Brain Res* 687: 114-124, 1995.
187. **Shaulian E, and Karin M.** AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E131-136, 2002.
188. **Sinner B, and Graf BM.** Ketamine. *Handb Exp Pharmacol* 313-333, 2008.
189. **Stip E, Chouinard S, and Boulay LJ.** On the trail of a cognitive enhancer for the treatment of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 219-232, 2005.
190. **Strayer RJ, and Nelson LS.** Adverse events associated with ketamine for procedural sedation in adults. *Am J Emerg Med* 26: 985-1028, 2008.
191. **Suh SW, Garnier P, Aoyama K, Chen Y, and Swanson RA.** Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 16: 538-545, 2004.
192. **Svensson TH.** Dysfunctional brain dopamine systems induced by psychotomimetic NMDA-receptor antagonists and the effects of antipsychotic drugs. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 320-329, 2000.
193. **Switzer RC, 3rd.** Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol Pathol* 28: 70-83, 2000.
194. **Taleisnik S.** Receptores celulares y la transducción de señales: capítulo 3: Receptores acoplados a proteínas G. *Primera edición, Argentina (Encuentro Grupo Editor) 2006, 7:24.*
195. **Tapia R.** Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares: capítulo 4: Muerte por estrés oxidativo: radicales libres y óxido nítrico (ON). *Primera Edición, México, editor María del Carmen Farías (Fondo de cultura económica) 1999, 56:63.*

196. **Thind KK, Yamawaki R, Phanwar I, Zhang G, Wen X, and Buckmaster PS.** Initial loss but later excess of GABAergic synapses with dentate granule cells in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 518: 647-667.
197. **Thomas JD, Weinert SP, Sharif S, and Riley EP.** MK-801 administration during ethanol withdrawal in neonatal rat pups attenuates ethanol-induced behavioral deficits. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 1218-1225, 1997.
198. **Tiihonen J, Halonen P, Wahlbeck K, Repo-Tiihonen E, Hyvarinen S, Eronen M, Putkonen H, Takala P, Mehtonen OP, Puck M, Oksanen J, Koskelainen P, Joffe G, Aar J, Hallikainen T, Ryyanen OP, and Tupala E.** Topiramate add-on in treatment-resistant schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Clin Psychiatry* 66: 1012-1015, 2005.
199. **Tomitaka M, Tomitaka S, Rajdev S, and Sharp FR.** Fluoxetine prevents PCP- and MK801-induced HSP70 expression in injured limbic cortical neurons of rats. *Biol Psychiatry* 47: 836-841, 2000.
200. **Tomitaka S, Tomitaka M, Tolliver BK, and Sharp FR.** Bilateral blockade of NMDA receptors in anterior thalamus by dizocilpine (MK-801) injures pyramidal neurons in rat retrosplenial cortex. *Eur J Neurosci* 12: 1420-1430, 2000.
201. **Turski WA, Cavalheiro EA, Calderazzo-Filho LS, Kleinrok Z, Czuczwar SJ, and Turski L.** Injections of picrotoxin and bicuculline into the amygdaloid complex of the rat: an electroencephalographic, behavioural and morphological analysis. *Neuroscience* 14: 37-53, 1985.
202. **Vann SD, Aggleton JP, and Maguire EA.** What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci* 10: 792-802, 2009.
203. **Vincent JP, Kartalovski B, Geneste P, Kamenka JM, and Lazdunski M.** Interaction of phencyclidine ("angel dust") with a specific receptor in rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4678-4682, 1979.
204. **Waldorf D.** Phencyclidine abuse, United States. In: Angel dust, an ethnographic study of PCP users. Eds Felman, Agar, Beschner Lexington, Lenxington Books, MA, USA, 1979, pp 53-71
205. **Wang CX, and Shuaib A.** NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4: 143-151, 2005.
206. **Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, and Sun AY.** Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31: 3-16, 2005.
207. **Wasterlain CG, and Chen JW.** Mechanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drugs. *Epilepsia* 49 Suppl 9: 63-73, 2008.
208. **Willis CL, and Ray DE.** Antioxidants attenuate MK-801-induced cortical neurotoxicity in the rat. *Neurotoxicology* 28: 161-167, 2007.
209. **Willis CL, Ray DE, Marshall H, Elliot G, Evans JG, and Kind CN.** Basal forebrain cholinergic lesions reduce heat shock protein 72 response but not pathology induced by the NMDA antagonist MK-801 in the rat cingulate cortex. *Neurosci Lett* 407: 112-117, 2006.
210. **Wood DM, Nicolaou M, and Dargan PI.** Epidemiology of recreational drug toxicity in a nightclub environment. *Subst Use Misuse* 44: 1495-1502, 2009.
211. **Wozniak DF, Brosnan-Watters G, Nardi A, McEwen M, Corso TD, Olney JW, and Fix AS.** MK-801 neurotoxicity in male mice: histologic effects and chronic impairment in spatial learning. *Brain Res* 707: 165-179, 1996.
212. **Wozniak DF, Dikranian K, Ishimaru MJ, Nardi A, Corso TD, Tenkova T, Olney JW, and Fix AS.** Disseminated corticolimbic neuronal degeneration induced in rat brain by MK-801: potential relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 5: 305-322, 1998.

213. **Yamaguchi M, and Mori K.** Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9697-9702, 2005.
214. **Yin HZ, Sensi SL, Ogoshi F, and Weiss JH.** Blockade of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels decreases oxygen-glucose deprivation-induced Zn²⁺ accumulation and neuronal loss in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 22: 1273-1279, 2002.
215. **Yogeeswari P, Semwal A, Mishra R, and Sriram D.** Current approaches with the glutamatergic system as targets in the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets* 13: 925-943, 2009.
216. **Yonezawa Y, Hondo H, Hashimoto K, Matsumoto T, Hirano M, Uchimura H, and Kuroki T.** Effect of phencyclidine on endogenous excitatory amino acid release from the rat anterior cingulate cortex--an in vivo microdialysis study. *J Neural Transm Gen Sect* 94: 235-240, 1993.
217. **Young D, and Dragunow M.** Non-NMDA glutamate receptors are involved in the maintenance of status epilepticus. *Neuroreport* 5: 81-83, 1993.
218. **Zatta P, Lucchini R, van Rensburg SJ, and Taylor A.** The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull* 62: 15-28, 2003.
219. **Zhang X, Boulton AA, Zuo DM, and Yu PH.** MK-801 induces apoptotic neuronal death in the rat retrosplenial cortex: prevention by cycloheximide and R(-)-2-hexyl-N-methylpropargylamine. *J Neurosci Res* 46: 82-89, 1996.
220. **Zhang X, Fan X, Mohapel P, Yu PH, and Boulton AA.** MK-801-induced expression of Fos protein family members in the rat retrosplenial granular cortex. *J Neurosci Res* 57: 719-729, 1999.
221. **Zuo DY, Wu YL, Yao WX, Cao Y, Wu CF, and Tanaka M.** Effect of MK-801 and ketamine on hydroxyl radical generation in the posterior cingulate and retrosplenial cortex of free-moving mice, as determined by in vivo microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav* 86: 1-7, 2007.

ANEXO